

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Ing. Bc. Jiří Vávra

Vliv alelických variant proteinu ABCG2 na transport kyseliny močové
Effect of ABCG2 allelic variants on the transport of uric acid

Diplomová práce

Vedoucí práce:
doc.RNDr.Ing.Vladimír Krylov, PhD.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.8.2019

.....

Ing.Bc. Jiří Vávra

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli doc.RNDr.Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za odborné vedení, motivaci a trpělivost. Rovněž touto cestou děkuji za neocenitelné rady, spolupráci a zasvěcení do tajů laboratorní práce své konzultantce Mgr. Andree Mančíkové. Moje díky patří i Mgr. Blance Stibůrkové za její nemalou finanční a materiální výpomoc.

Abstrakt:

Kyselina močová je u člověka a vyšších primátů hlavním metabolitem vznikajícím degradací purinů. Její zvýšená hladina v séru, tzv. hyperurikemie, může být příčinou vzniku dny a dalších souvisejících chorob. Pro řízení urikemie mají vliv četné transportní proteiny, které se nacházejí v epitelu proximálního tubulu ledvin. Při poruše činnosti některého z nich může tedy být narušena hladina kyseliny močové v krvi. Celogenomovými GWAS studiemi bylo zjištěno, že často bývá při těchto patologických stavech postihnut transportér ABCG2, který se za normálních okolností podílí na secernaci kyseliny močové do moči. Cílem práce je, na modelu nematurovaných oocytů Žáby *Xenopus laevis*, ověřit in vitro schopnost alelických variant ABCG2 přenášet kyselinu močovou. Tyto alelické varianty pocházejí z celogenomových studií provedených Revmatologickým ústavem při 1.LF v Praze. Transport kyseliny močové bude srovnán s wild type variantou transportéru.

Klíčová slova:

Kyselina močová, GWAS studie, *Xenopus Laevis*, membránové transportéry, ABCG2

Abstract:

Uric acid is a main metabolite of purine degradation in humans and in higher primates. Its increased plasmatic level is called hyperuricemia and may be the cause of gout and many other similar diseases. Uricemia is controlled by many transporters, which are located in proximal tubule of human kidney. When some transporter have abnormal function, the physiological plasmatic level of uric acid may be impaired. In genome wide association study (GWAS) it was discovered that some hyperuricemia or gout patients have ABCG2 protein damaged. This protein carries out uric acid from epithelial cell to the urine. The goal of this diploma thesis is the determination of transport capacity of ABCG2 allelic variants found via GWAS (Institute of Rheumatology of 1st medical faculty UK in Prague) in vitro with *Xenopus laevis* oocyte expression system. Uric acid secretion was compared with wild type variant.

Keywords:

Uric acid, GWAS study, *Xenopus laevis*, membrane transport protein, ABCG2

Obsah

1. Seznam zkratk.....	3
2. Úvod	6
2.1. Význam kyseliny močové ve fylogenezi a fyziologii	6
2.2. Poruchy hladiny kyseliny močové v séru a jejich patologické důsledky.....	6
2.3. Celogenomové studie (GWAS)	7
2.4. Transportom v proximálním tubulu nefronů lidských ledvin	8
2.4.1. Transportér SLC22A8 - OAT3	9
2.4.2. Transportér SLC22A6 - OAT1.....	10
2.4.3. Transportér SLC22A11 - OAT 4	10
2.4.4. Transportér SLC2A9 - GLUT9, URATv1.	11
2.4.5. Transportér SLC22A12 - URAT1.....	12
2.4.6. Transportér SLC17A1 (NPT1).....	12
2.4.7. Transportér ABCC4 (MRP4)	13
2.5. ABCG2 (BCRP) jako další z transportérů kyseliny močové.....	13
2.5.1. Struktura ABCG2.....	13
2.5.2. Substráty a inhibitory ABCG2	16
2.5.3. Význam ABCG2 v ledvině.....	17
2.5.4. Význam ABCG2 v dalších orgánech	18
2.5.4.1. Játra	18
2.5.4.2. Střevo	19
2.5.4.3. Centrální nervová soustava	19
2.5.4.4. Varle	20
2.5.4.5. Placentální tkáň	20
2.5.4.6. Fenotyp postranní populace	21
2.6. Alelické varianty ABCG2 a jejich vliv na transport kyseliny močové v ledvině.....	21
2.6.1. Q141K (C421A, rs2231142)	22
2.6.2. V12M (G34A, rs2231137)	23
2.6.3. Q126X (C376T, rs72552713).....	23
2.6.4. T153M (C458T, rs753759474)	23
2.6.5. S476P (nepopsána).....	24
2.6.6. R147W (C439A, rs372192400)	24
2.6.7. D620N (G1858A, rs34783571).....	24
2.6.8. F373C(T1118A, rs752626614), T434M (C1301T, rs769734146)	25
2.6.9. K360del (rs750972998)	25

2.6.10.	I206L (A616C)	25
2.6.11.	K86M	25
2.6.12.	M71V	26
3.	Cíle diplomové práce	26
4.	Materiál a metody	27
4.1.	Materiál	27
4.2.	Plazmidy, oligonukleotidy a chemikálie	27
4.3.	Přístroje	28
4.4.	Roztoky	28
4.5.	Metody	28
4.5.1.	Oligonukleotidem řízená mutagenese	28
4.5.2.	Transformace bakterií a izolace pDNA z klonů	31
4.5.3.	Restrikční analýza	32
4.5.4.	Sekvenace pDNA	33
4.5.5.	Izolace pDNA z cílového klonu	34
4.5.6.	Sekvenace	36
4.5.7.	Transkripce <i>in vitro</i>	36
4.5.8.	Odběr oocytů z <i>X.laevis</i> v celkové anestezii	36
4.5.9.	Příprava oocytů	37
4.5.10.	Mikroinjekce do oocytů a inkubace	37
4.5.11.	Funkční studie s ¹⁴ C značenou kyselinou močovou	37
4.5.12.	Analýza aktivity radioaktivního urátu	38
4.5.13.	Příprava vzorků na imunodetekci a Western blot	38
4.5.14.	Imunodetekce na membráně	39
5.	Výsledky	40
5.1.	Měření první skupiny alelických variant	40
5.2.	Měření druhé skupiny variant	41
5.3.	Celkové výsledky a statistika	42
5.4.	Analýza exprese ABCG2 alelických variant pomocí Western blotu	49
6.	Diskuze	53
6.1.	Uptake urátu oocyty <i>Xenopus laevis</i>	53
6.2.	Funkční studie alelických variant transportéru ABCG2	56
7.	Závěr	67
8.	Literatura	68

1. Seznam zkratek

ARP	Actin related protein 3	Protein asociovaný s aktinem 3
BCRP	Breast cancer resistance protein	Protein rezistence rakoviny prsu
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosin monofosfát
CB-2	Cannabinoid receptor type 2	Kanabinoidní receptor typu 2
CREB	cAMP response element binding protein	Protein vázající se na DNA vlivem cAMP
cRNA	komplementární mRNA	
DEPC	Diethylpyrokarbonát	
DMSO	Dimethyl sulfoxid	
DPM	Desintegration per minute	Počet rozpadů za minutu
EcoR1	Restrikční endonukleáza	
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid	Kyselina ethylendiamin tetraoctová
Era	Estrogen receptor α	Estrogenový receptor α
GWAS	Genome wide association study	Celogenomová studie
HEK293	Human embryonic kidney cell line	Buněčná linie lidských embryonálních ledvin
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1	Hypoxií indukovatelný faktor 1
Km	Konstanta Michaelis – Mentenové	
KO-143	(3S,6S,12aS)-1,2,3,4,6,7,12,12a-Oktahydro-9-methoxy-6-(2-methylpropyl)-1,4-dioxopyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-3-propanoát 1,1-dimethylethyl ester	
LLC-PK	Epithelial-like pig kidney cell line	Linie epiteliálních prasečích buněk
MAPK	Mitogen activated protein kinase	Mitogeny aktivovaná protein kináza
MG-132	Benzyl N-[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate	

MRP4	Multidrug resistance protein 4	Protein mnohočetné lékové rezistence
MS-222	Tricain methansulphate	Trikain methansulfát
MSX-2	Msh homeobox 2	Msh homeobox 2
ND-96	kultivační médium pro oocyty	
NPT1	Sodium dependent phosphate	Sodno – fosfátový transportní protein
OAT	Oorganic anion transporter	Transportér organických aniontů
OR-2	Kultivační médium pro oocyty ()	
PBST	Phosphate bufferd saline + 0,1% Tween 20	
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
pDNA	Plazmidová DNA	
PHip	2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazol(4,5)pyridin	
PI3K	Phosphatidyl inositol kinase 3	Fosfatidyl kináza číslo 3
PPAR	Peroxisomal proliferator activated factor	Faktor aktivovaný peroxisomální proliferací
PRB	Progesteron receptor B	Progesteronový receptor typu B
PXR	Pregnane X receptor	Receptor X pro pregnan
ROL	Renal overloading	Přetížení ledvin
RUE	Renal under excretion	Patologicky nízká renální exkrece
SAM	S-Adenosyl methionin	
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 cell line	Buněčná linie <i>S. frugiperda</i> 9
SLC	Solutu carrier family	Rodina přenašečů rozpuštěných látek
Sn-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin	7-etyl-10-hydroxykamptotecin
SOC medium	Tekutá půda pro kultivaci bakterií	
SP1	Specifity protein 1	Specifický protein číslo 1 (transkripční faktor)
TPB	Triphosphate broth	Tekutá půda pro kultivaci bakterií

Xbp-1	X-box binding protein 1	X-box vazebný protein číslo 1
Xho1	Restrikční endonukleáza	

2. Úvod

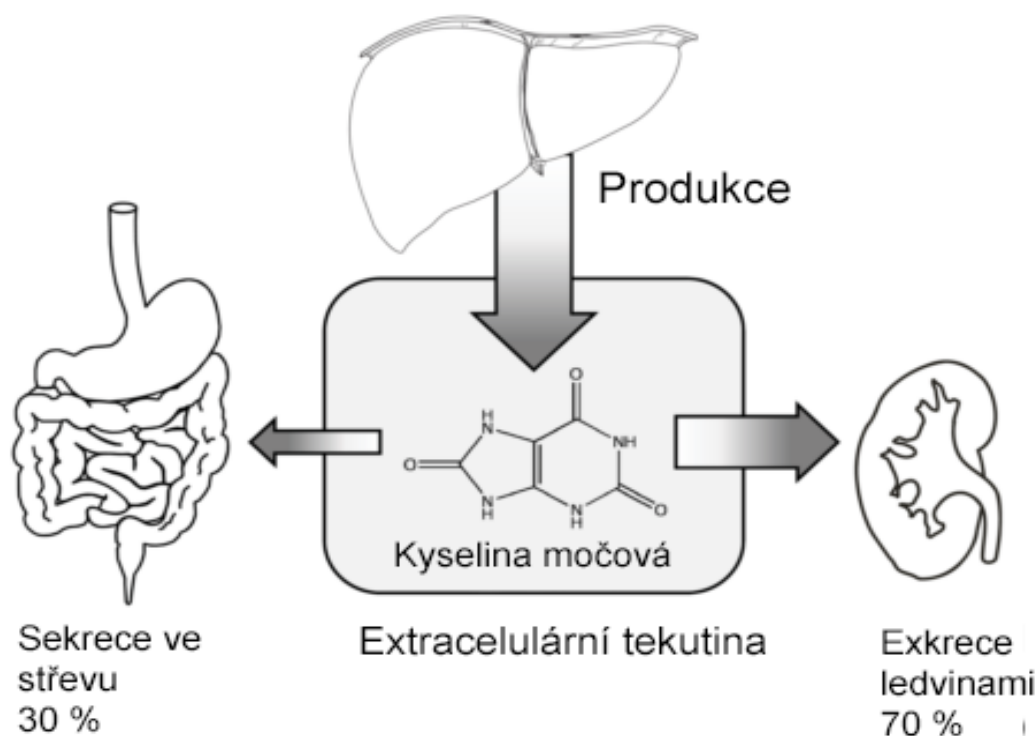
2.1. Význam kyseliny močové ve fylogenezi a fyziologii

Kyselina močová (aniont urát) vzniká z xantinu, jako konečný produkt degradací purinů. Navazující metabolickou drahou je pak hydroxylována na 5-hydroxyizourát a dále na allantoin. První krok této reakce zajišťuje enzym urát oxidáza. Tento enzym je u člověka a velkých opic (rody šimpanz, gorila, orangutan) pseudogenem a tak nedochází k jeho přepisu do mRNA (Ramazzina et al. 2006; Kratzer et al. 2014). Následkem toho není kyselina močová u těchto savců dále metabolizována, což vede ke zvýšení její hladiny v séru oproti ostatním obratlovcům s funkční urát oxidázou. Kyselina močová v séru působí jako antioxidant, i když se zdá, že její role v ochraně lipidů a proteinů je spíše podružná (Ames et al. 1981; Hershfield et al. 2010). Nicméně kyselina močová je schopna neenzymaticky reagovat s některými typy radikálů a odstraňovat je tak z plazmy (Kim et al. 2009). Dále byla také vyslovena hypotéza, že díky podobnosti se stimulanty mozkové činnosti jako jsou kofein a nebo theobromin, se kyselina močová mohla podílet na stimulaci růstu mozku u primátů a předků člověka. Rovněž poskytuje zřejmě ochranu proti toxickému působení glutamátu a v součinnosti s gliovou tkání chrání před jeho účinky vlastní neuronální síť (Orowan E. 1955; Du et al. 2007). Zřejmě také brání monocytům ve stimulaci nadměrné propustnosti cév prostřednictvím peroxynitrilového radikálu a nespecifickému průniku do tkání, kde by mohli vyvolávat zánětlivou odpověď (Scott and Hooper 2001). Zvýšení sérové hladiny kyseliny močové má za následek zvýšení krevního tlaku. U předků člověka, kteří přecházeli z kvadrupední polohy do vzpřímeného postoje, mohla kyselina močová sehrát významnou roli právě ve stabilizaci krevního tlaku. Tímto způsobem tak nahradila účinek chloridu sodného, jehož příjem v potravě byl u těchto našich předků zřejmě nízký (Watanabe et al. 2002). Lze tedy shrnout, že ztráta urát oxidázové aktivity a zvýšení hladiny urátu v séru vedla v evoluci k vytvoření podmínek vhodných pro vývoj moderního člověka. Dále také kyselina močová napomáhá ochraně mozku, pomáhá tlumit nežádoucí projevy imunitního systému, podílí se na redukci radikálového poškození tkání a napomáhá udržení krevního tlaku.

2.2. Poruchy hladiny kyseliny močové v séru a jejich patologické důsledky

Centrem vylučování kyseliny močové je ledvina (asi 70%), resp. nefron a také epitel střeva (asi 30 %) - viz obr. 1. V ledvině je urát spolu s ostatními nízkomolekulárními látkami filtrován v glomerulu. Následně dochází k jeho masivní reabsorpci v

proximálním tubulu, přičemž asi 5 % z něj odchází neresorbováno do definitivní moči. V proximálním tubulu může docházet také k secernaci urátu do primárního filtrátu. Diurézou člověk denně vyloučí 300 - 800 mg kyseliny močové. Normální koncentrace kyseliny močové v séru člověka (tzv. normourikemie) se pohybuje u mužů mezi 120 - 420 μM a u žen mezi 120 - 340 μM . Hodnoty koncentrace vyšší než tyto limity označujeme jako hyperurikemie. Zvýšená hladina kyseliny močové může být také příčinou dny, onemocnění, jež se projevuje mimo jiné srážením krystalků moči v kloubech, jež ve svém důsledku vedou k chronickým zánětlivým projevům v kloubech (Sundy and Hershfield 2007). Ve Spojeném Království se odhaduje výskyt dny na 2,5 % dospělých jedinců, ve Spojených státech 3,9 % dospělých jedinců (Kuo et al. 2015; Lawrence et al. 2008). Celogenomové (GWAS) studie prokázali souvislost mezi rizikem vzniku dny a genetickými predispozicemi (Vitart et al. 2008; Kolz et al. 2009).



Obrázek 1 Schéma vylučování kyseliny močové. Převzato z (Bobulescu and Moe 2012)***

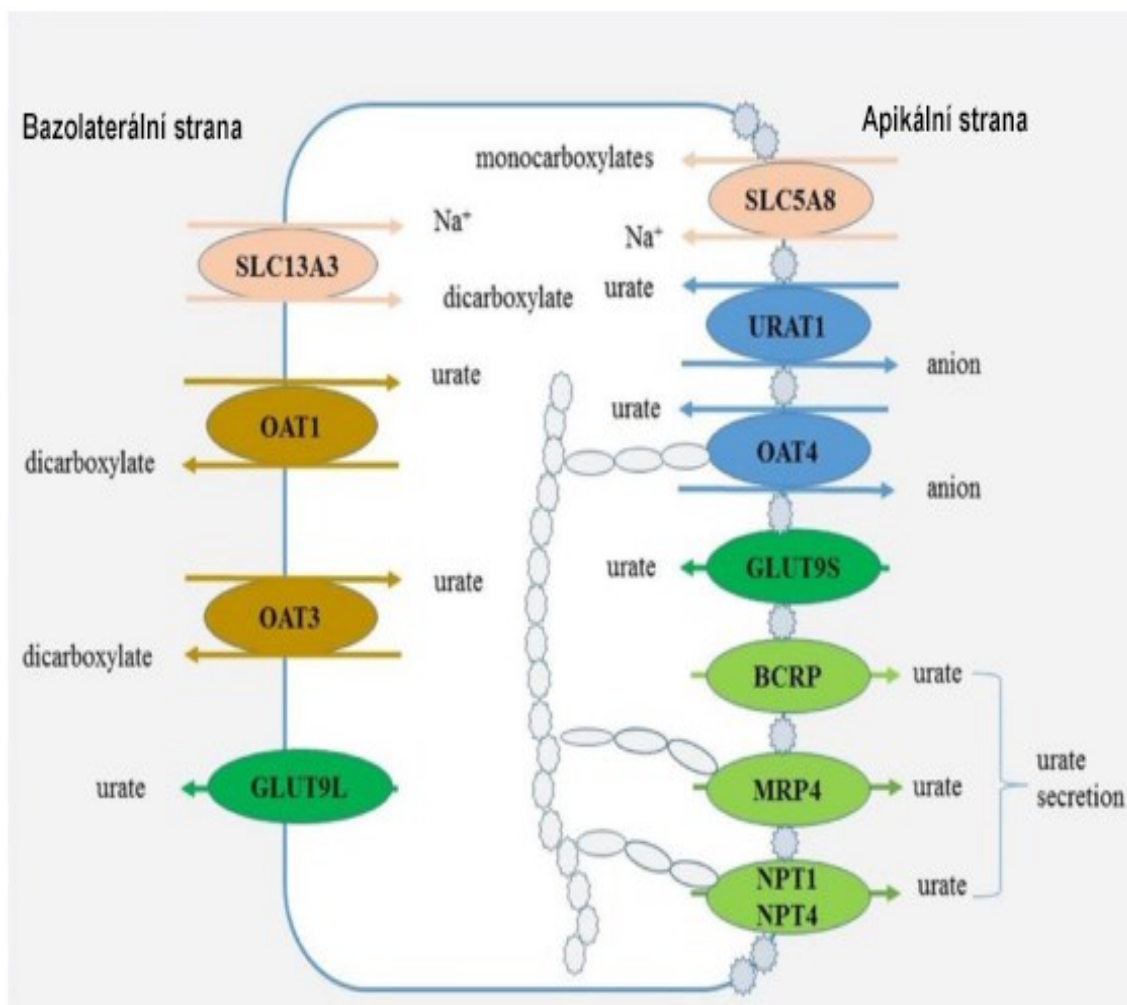
2.3. Celogenomové studie (GWAS)

Vliv různých jednobodových polymorfismů (SNP) představujících alelické varianty se vyšetřuje prostřednictvím celogenomových studií (GWAS - Genom Wide Association

Study). První GWAS studie byla provedena v roce 2002 a zjišťovala korelaci výskytu SNP v genech NFKIL1, BAT1 a LTA s rizikem vzniku infarktu myokardu, přičemž právě SNP v LTA má souvislost s rizikem vzniku infarktu (Ozaki et al. 2002). Tyto studie jsou obvykle navrženy a prováděny s dvěma sledovanými skupinami - kontrolní a případovou, případně se sleduje projev určitého fenotypového znaku. Následuje izolace genomové DNA, detekce jednotlivých variant a vyhodnocení signifikantně významných variant (McCarthy et al. 2008)^{***}. V případě onemocnění způsobených zvýšenou koncentrací kyseliny močové v krvi bylo provedeno mnoho celogenomových studií, které identifikovali jednobodové záměny či případně jiné alelické varianty v genomu člověka (S. Li et al. 2007; Vitart et al. 2008; Kolz et al. 2009; Köttgen et al. 2013). Tyto SNP postihují transportní proteiny v proximálním tubulu ledvin člověka, kde dochází k reabsorpci nebo sekreci urátu. Jedním z významných transportérů je, vedle dalších, protein ABCG2 (Dehghan et al. 2008; D. Zhou et al. 2014; R. Li et al. 2015; Stiburkova et al. 2017). Cílem této diplomové práce je provést *in vitro* analýzu alelických variant proteinu ABCG2 na transport kyseliny močové. V následujícím teoretickém úvodu uvedu základní přehled o proteinech transportujících kyselinu močovou v proximálním tubulu člověka, o struktuře a fyziologické funkci proteinu ABCG2 a o známých jednonukleotidových polymorfismech v ABCG2 majících vliv na transport urátu.

2.4. Transportom v proximálním tubulu nefronů lidských ledvin

Funkční jednotkou savčích ledvin je nefron, skládající se z proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu a sběrného kanálku ústícího do ledvinné pánvičky. V proximálním tubulu ledvin dochází k sekreci či reabsorpci velké řady nízkomolekulárních látek. Tubulus samotný je kryt těsným epitelem s buňkami opatřenými kartáčovým lemem na apikální straně. Na apikální i bazolaterální membráně epiteliálních buněk proximálního tubulu lidských ledvin se nachází řada transportérů, které se podílejí na transportu kyseliny močové. Porucha každého z nich může způsobit hyperurikemii, dnu, případně další onemocnění spojená s vysokou koncentrací kyseliny močové v plazmě. Na obrázku 2 uvádím stručný přehled těchto transportních proteinů.



Obrázek 2 Transportom v epiteliální buňce proximálního tubulu lidské ledviny. Upraveno podle (Z. Wang et al. 2019)***.

2.4.1. Transportér SLC22A8 - OAT3

OAT3 byl poprvé popsán u myši postižených osteosklerózou jako membránový protein s dvanácti transmembránovými smyčkami. Protein u myši je kódován mRNA délky 2,1 kb a jeho polypeptid je tvořen 554 aminokyselinami. Molekulární hmotnost je okolo 66 kDa (Brady et al. 1999). U myši je exprimován v proximálním i distálním tubulu (Hwang et al. 2010). Obdobně jako OAT1 je transportér OAT3 umístěn na bazolaterální membráně epiteliálních buněk proximálního tubulu (Windass et al. 2007). Jak u člověka, tak i u myši se oba geny pro transportéry OAT1 a OAT3 vyskytují na chromozomu v těsné blízkosti, což by mohlo být výhodné pro hospodárnou expresi obou proteinů v cílové tkáni (Eraly, Hamilton, and Nigam 2003). Na modelu myši s knockoutovaným OAT3 byla zjištěna snížená secernace kyseliny močové do moči, což naznačuje, že kyselina močová je substrátem tohoto transportéru (Eraly et al. 2008). Mezi další substráty OAT3 vylučované do moči patří citrát, alfa-ketoglutarát, 4-

hydroxyfenylacetát. V experimentální praxi je hojně využívaný substrát estron-3-sulfát (Wu et al. 2013; Windass et al. 2007). Transport substrátu je zřejmě (stejně jako u všech ostatních transportérů rodiny OAT) poháněn dikarboxylátovými ionty, jako je alfa-ketoglutarát (Pritchard 1988).

2.4.2. Transportér SLC22A6 - OAT1.

Tento transportér byl objeven v roce 1997 v ledvinách a v nižší míře exprese i v mozku myši. V ledvinách je lokalizován v epitelálních buňkách proximálního tubulu. Transkript je tvořen mRNA délky 2,5 kb, přičemž polypeptid obsahuje 546 aminokyselinových zbytků s 11 transmembránovými smyčkami. Lidská varianta má 550 aminokyselinových zbytků (Lopez-Nieto et al. 1997; Lu, Chan, and Schuster 1999). U člověka se nachází na chromozomu 11q13.1-q13.2 a má čtyři sestřihové varianty (Bahn et al. 2000; Makoto Hosoyamada et al. 1999). V další práci byl potvrzen transport organického aniontu para-aminohypurátu (Pavlova et al. 2000). Myší ortolog transportéru OAT1 byl lokalizován na bazolaterální stranu epitelálních buněk (Sweet, Wolff, and Pritchard 1997). Rovněž lidský ortolog OAT1, vyznačující se transportem paraaminohypurátu, byl lokalizován na bazolaterální stranu proximálního tubulárního epitelu ledvin (Lu, Chan, and Schuster 1999). Dále bylo zjištěno, že OAT1 transportuje kyselinu močovou a to směrem do lumen nefronu (stejně tak i OAT3). Dalšími substráty, jež jsou secernovány do proximálního tubulu tímto transportérem patří barvivo fluorescein nebo kličkové antidiuretikum furosemid. Na modelu myši s vyřazeným transportérem OAT1 byla zjištěna změněná koncentrace 4-hydroxyfenylpyruvátu, hydroxyfenyllaktátu, N-acetylaspartátu a 4-hydroxyfenylacetátu a benzoátu v séru a moči, což naznačuje, že se jedná o substráty OAT1. U těchto myší je rovněž snížena secernace orotátu, uracilu, propyonylglycinu či hexanoylglycinu (Eraly et al. 2008, 2006).

2.4.3. Transportér SLC22A11 - OAT 4

Tento transportér byl popsán v roce 2000 v ledvinách člověka. Později byl detekován i v placentě. V jiných orgánech se nevyskytuje. Transportér je kódován v ledvinách 2,21 kb dlouhou mRNA a tvoří ho 550 aminokyselin dlouhý polypeptid. V experimentu na oocytech *X. laevis* byl zjištěn transport estron sulfátu, ochratoxinu A

a paraminohippurátu. Transportér zajišťuje uptake substrátu, nikoliv jeho eflux (Cha et al. 2000). Další výzkum přinesl poznatek, že se OAT 4 nachází na apikální membráně buněk proximálního tubulu. Navíc bylo zjištěno, že jde o antiporter, který přenáší substrát na účet gradientu dikarboxylátových iontů (Ekaratanawong et al. 2004). Jedním z fyziologicky významných substrátů je také kyselina močová, urát, která je tímto proteinem vychytávána z moči a přenášena do cytoplazmy epiteliální buňky. Tento uptake je 2,6 - krát zvyšován diuretikem hydrochlorothiazidem (Hagos et al. 2007). Podíl na absorpci kyseliny močové byl potvrzen i celogenomovou studií, i když nebyl prokázán vliv na výskyt dny (Glazer et al. 2012). Ani v další studii nebyl potvrzen vliv na rozvoj dny, ale bylo ukázáno, že poškození transportéru může být příčinou jistého subtypu typu dny, který spočívá v snížení renální exkrece (RUE - renal underexcretion) (Akiyama et al. 2014).

2.4.4. Transportér SLC2A9 - GLUT9, URATv1.

GLUT9 byl popsán jako člen rodiny proteinů transportující glukózu. Gen SLC2A9, který ho kóduje, je umístěn na chromozomu 4p15.3-16. Transkript o velikosti 1,9 kbp je překládán do proteinu o velikosti 540 aminokyselinových zbytků s 12 transmembránovými smyčkami (Phay, Hussain, and Moley 2000). Další práce ukázali, že GLUT9 se vyskytuje ve dvou izoformách - krátké (12 exonů) a dlouhé (13 exonů), přičemž obě se liší pouze v N-koncové sekvenci. Oba se vyskytují v buňkách epitelu proximálního tubulu ledvin, přičemž krátká varianta na bazolaterální membráně a dlouhá spíše na apikální membráně (Augustin et al. 2004). Záhy však bylo zjištěno, že GLUT9 vykazuje transportní aktivitu pro kyselinu močovou a to větší než pro fruktózu, o které bylo uvažováno jako o hlavním substrátu (Vitart et al. 2008). GLUT9 byl také nalezen v chondrocytech lidské chrupavky a podílí se tak zřejmě na depozici kyseliny močové do synoviální tekutiny kloubů při dnavých onemocněních (Richardson et al. 2003). U myši s knockoutem pro GLUT9 bylo zjištěno městnání krystalů kyseliny močové v nefronech, což je známka ztráty schopnosti reabsorbovat urát zpět do krevního oběhu. Specifický knockout GLUT9 u myši v ledvinných nefronech potvrzuje předchozí závěr, ale zároveň ukazuje, že hladina urátu v séru se téměř nemění. To naznačuje existenci dalších mechanismů zajišťujících homeostázu urátu v organismu (Bonny et al. 2009; Auberson et al. 2018). U člověka byla rovněž prokázána korelace hladiny kyseliny močové v séru a případnými jednobodovými záměnami v sekvenci

SLC2A9, přičemž v některých případech dochází i k selhání ledvin (Claverie-Martin et al. 2018; Voruganti et al. 2015).

2.4.5. Transportér SLC22A12 - URAT1

URAT1 je kódován genem SLC22A12 na chromozomu 11q13. Je to transportér lokalizovaný na apikální straně epitelálních buněk proximálního tubulu a jde o antiporter urátu za anionty. Svou přítomností zajišťuje absorpci kyseliny močové z primárního filtrátu, tudíž jeho dysfunkce způsobuje u pacientů snížení její koncentrace v plazmě (Enomoto et al. 2002). U myši s vyřazenou funkcí tohoto transportéru dochází ke zvýšení koncentrace kyseliny močové v definitivní moči o 39 %. Koncentrace urátu v séru však byla téměř stejná u divokých i knockoutovaných jedinců, což naznačilo přítomnost dalších transportérů podílejících se na reabsorpci urátu (M. Hosoyamada et al. 2010). Současně i u pacientů trpících hypourikemií nemusí být postižen transportér URAT1, což opět naznačovalo účast jiných transportních proteinů na reabsorpci kyseliny močové z primární moči (Tzouvaras et al. 2007). Poškození URAT1 jednobodovými záměnami má však vždy na svědomí hypourikemii. To podporuje předpoklad, že URAT1 je skutečně hlavní reabsorbční transporter v lidských ledvinách (Ichida et al. 2004). Je známo více mutací, které mají na svědomí sníženou transportní schopnost proteinu a tudíž i sníženou hladinu urátu v séru (Claverie-Martin et al. 2018). Transport kyseliny močové tímto transportérem lze blokovat benzomaronem, pyrazimadem nebo probenicidem (Ichida et al. 2004).

2.4.6. Transportér SLC17A1 (NPT1)

U člověka byl tento transportér detekován již roku 1993. Je kódován 2,5 kb dlouhou mRNA a představuje polypeptid o 467 aminokyselinových zbytcích o molekulové hmotnosti 51 kDa. Gen SLC17A1 je umístěn na chromozomu 6p21.3 - p23. (Chong et al. 1993). Homeologní protein se nachází i u myši, a to na chromozomu 13 (Chong et al. 1994). Transportér NPT1 přenáší substrát z cytoplazmy směrem do lumen nefronu a to na účet gradientu chloridových iontů - funguje tedy jako antiporter. Transport je blokován furosemidem (Uchino et al. 2000). Další analog NPT1 se vyskytuje u králíka, kde byl lokalizován na apikální membráně epitelálních buněk proximálního tubulu. Jeho velikost byla stanovena na 64 kDa (Custer et al. 1993). U člověka je rovněž NPT1 lokalizován na apikální membráně proximálního tubulu. Fyziologickým substrátem je kyselina močová, která je stejně jako další substráty

měněna za chloridový iont. Mutace I269T v sekvenci transportéru je často zodpovědná za zvýšenou secernaci kyseliny močové do primární moči. Dalším ze substrátů tohoto proteinu je experimentálně používaný substrát paraaminohyppurát (Chiba et al. 2015; Iharada et al. 2010).

2.4.7. Transportér ABCC4 (MRP4)

Protein je u člověka lokalizován v močovém měchýři, plicích a také v ledvinách, kde se nachází na apikální membráně buněk proximálního tubulu. Jako typický ABC transportér přenáší substrát (kterým je také například cGMP a cAMP) prostřednictvím energie uvolněné hydrolýzou ATP (Kool et al. 1997). Molekulární hmotnost transportéru se pohybuje okolo 150 kDa (Lai and Tan 2002). Transportér přenáší kyselinu močovou a to dokonce současně s přenosem výše zmíněného cAMP, cGMP (Van Aubel et al. 2004). Jednobodové záměny (například P1036L) v primární struktuře proteinu vedou ke změnám hladiny kyseliny močové v séru (Kolz et al. 2009).

O ABCG2, dalším z transportérů na epitelálních buňkách proximálního tubulu pojednává další kapitola.

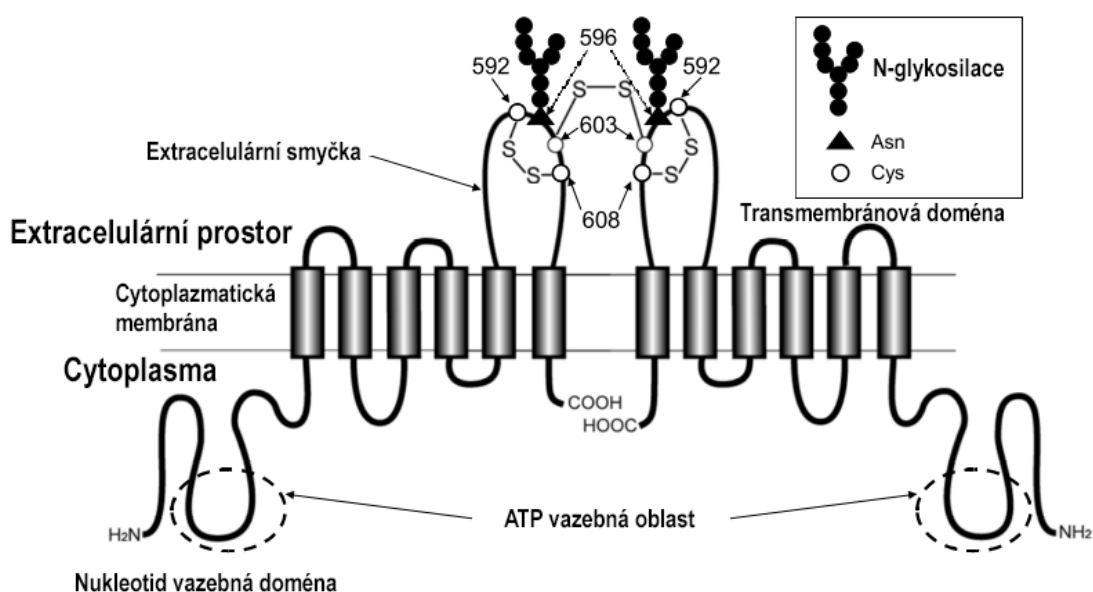
2.5. ABCG2 (BCRP) jako další z transportérů kyseliny močové

Vyselektovaný subtyp buněčné linie MCF-7 odvozené z karcinomu prsu vykazoval rezistenci proti cytostatiku doxorubicinu. Záhy bylo zjištěno, že tato linie buněk exprimuje transportér z rodiny ABC (ATP binding cassette), který aktivně z cytoplazmy transportuje cytostatika metotrexát, daunorubicin a doxorubicin a tím způsobuje rezistenci buněk k těmto látkám. Transportér byl nazván BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). Později byla potvrzena příslušnost k ABC rodině a gen a jím kódovaný transportér byl systematicky označen jako ABCG2 (Doyle, Ross, et al. 1998; Miyake et al. 1999).

2.5.1. Struktura ABCG2

Primární struktura ABCG2 čítá 655 aminokyselin, má šest transmembránových smyček, přičemž oba konce polypeptidu ční do cytoplazmy (H. Wang, Lee, Cai, et al. 2008). Podjednotka transportéru se (stejně jako všechny ABC transportéry) skládá z nukleotid vazebné a transmembránové části, které jsou navzájem spojené peptidovým

linkerem (László et al. 2016). Nukleotid vazebná doména obsahuje oba Walkerovy motivy - walkerův motiv A v pozici G80-S89 a walkerův motiv B v pozici I206 a D210 (Miyake et al. 1999). Walkerovy motivy se obecně účastní vazby a hydrolýzy ATP (Walker et al. 1982). Transportér je složen ze dvou podjednotek o molekulární hmotnosti 70 - 75 kDa, jež spolu dohromady tvoří homodimer (K. K. Kage et al. 2002). Dimerizace probíhá na základě oxidace SH skupin cysteinu v pozici 603. Dimer je tedy spojen jedním disulfidickými můstky, druhý můstek tvořený cysteinem 608 je intramolekulární (K. Kage, Fujita, and Sugimoto 2005; Wakabayashi et al. 2007; Shigeta et al. 2010). ABCG2 je v endoplazmatickém retikulu glykosylován na asparaginu č. 596. Po odstranění této glykosylace klesá podíl maturovaného proteinu. Naopak starší články nepovažují glykosylaci za nutnou podmínku transportu k membráně. V buněčných liniích nebyla zjištěna fosforylace proteinu a nezdá se, že by byla nutná pro transport (Mohrmann et al. 2005; Nakagawa et al. 2009). Strukturu homodimeru ABCG2 schematicky ukazuje obrázek 3.



Obr. 3. Schematické znázornění transportéru ABCG2. Upraveno podle (Ishikawa et al. 2012)

Transportér ABCG2 je u člověka lokalizován na chromosomu 4q21-q22. Gen ABCG2 má délku 66 kbp a skládá se ze 16 exonů a 15 intronů. První exon obsahuje 5' nepřekládanou oblast a druhý exon již obsahuje start kodon. Asi 450 párů bazí od prvního exonu proti směru transkripce se nachází CpG ostrov, promotor se nalézá 312 bp upstream (Knutsen et al. 2000; Bailey-Dell et al. 2001). K zahájení transkripce je nutná demethylace výše zmíněného CpG ostrovu a promotorové oblasti (To et al. 2006; Nakano et al. 2008). Po odstranění těchto metylačních značek může dojít ke spuštění

transkripce. Zvláštností je zvýšení exprese ABCG2, pozorované u termorezistentní buněčné linie při kultivaci za zvýšené teploty (Stein et al. 2002). Proteosyntéza ABCG2 je zvyšována vazbou na aryl hydrokarbonový receptor (AhR), na nějž se často váží xenobiotika. Jeho stimulace ligandem vede ke zvýšení transkripce i translace transportéru (Ebert et al. 2005). Dále pak expresi ABCG2 zvyšuje stimulace receptoru PPAR (Peroxisomal proliferator - activated factor), pro nějž byl nalezen enhancer o velikosti 150 bp vzdálený 3796 párů bází proti směru transkripce. Tato regulace byla popsána ve více buněčných typech (Szatmari et al. 2006; M. T. Hoque et al. 2015). Dalším receptorem zvyšujícím proteosyntézu transportéru je progesteronový receptor typu B (PRB). Naopak progesteronový receptor typu A reprimuje účinek PRB a expresi spíše snižuje. Vazebný region pro progesteronový receptor se nachází v pozici -243 až +362 párů bází (H. Wang, Lee, Zhou, et al. 2008). PXR (Pregnane X receptor) receptor zřejmě zvyšuje expresi ABCG2. Látky, jako jsou PCN nebo dexomethason, zvyšují expresi prostřednictvím receptoru PXR. Naopak při podání antagonisty tohoto receptoru, ketokonazolu, dochází ke ztrátě schopnosti upregulace (Whyte-Allman et al. 2017). Významnou dráhou vedoucí k regulaci syntézy ABCG2 je transkripční faktor CREB, který je aktivován hladinou cAMP. Expresi ABCG2 může snižovat anandamid snížením koncentrace cAMP a tím i fosforylací CREB (Szilagyi et al. 2019). Fosforylací transkripčního faktoru CREB dochází k jeho vazbě na CRE motiv promotoru a indukcii exprese ABCG2. Fosforylace CREB faktoru je umožněna například kinázami PI3K a MAPK, které mohou být řízeny aktivací dráhy pro EGF (epidermální růstový faktor) (Xie et al. 2015). Expresi ABCG2 se také zvyšuje při nadměrné syntéze špatně sbalených proteinů, způsobených nesprávnou funkcí endoplazmatického retikula. Indukce exprese ABCG2 probíhá totiž také prostřednictvím Xbp-1 a HIF - 1 rozpoznávacích sekvencí v promotorových oblastech. Zvýšení exprese ABCG2 je zřejmě snahou buněk zbavit se látek poškozujících správný folding proteinů v endoplazmatickém retikulu (Nakamichi et al. 2009). Při nízkém parciálním tlaku kyslíku dochází k inhibici degradace transkripčního faktoru HIF-1, který po dimerizaci se svým partnerem aktivuje transkripci genu pro ABCG2. Nižší parciální tlak kyslíku tedy vede k expresi ABCG2 (Nishihashi et al. 2017; Krishnamurthy et al. 2004). Mezi další transkripční faktory spouštějící expresi, zejména u rakovinných buněk, patří MSX-2. Tento transkripční faktor spouští produkci ABCG2 interakcí s faktorem SP1, jehož vazba na promotor je pro zahájení transkripce zásadní. Tato regulace byla popsána u buněčných linií pocházejících z karcinomů pankreatu (Hamada et al. 2012).

Snížení exprese ABCG2 může probíhat například působením 17- β -estradiolu na receptor ER α (Imai et al. 2005). Aktivita transportéru je také regulována množstvím membránového cholesterolu. U buněk s membránou nabohacenou cholesterolem roste transportní aktivita proteinu. Naopak buňky se sníženým obsahem cholesterolu v membráně vykazují sníženou aktivitu ABCG2. Za vazbu cholesterolu je zřejmě zodpovědný motiv v okolí tyrosinu 413 (Telbisz et al. 2007; Gál et al. 2015). Kromě cholesterolu také aktivitu proteinu co do transportu modifikují žlučové kyseliny jako cholát, taurocholát a deoxycholát (Telbisz et al. 2012). Internalizaci a degradaci ABCG2 v lysozomu spouští rostlinné alkaloidy jako kofein, teofilin či difilin (Ding et al. 2012).

2.5.2. Substráty a inhibitory ABCG2

První identifikované substráty jsou převážně cytostatika, protože transportér byl objeven u nádorových buněk rezistentních právě k léčbě těmito látkami. Modelovým substrátem, který se zároveň řadí mezi klinicky významná cytostatika je metotrexát (kyselina(2S)-2-[(4-[(2,4-Diaminopteridin-6-yl)methyl](methyl)amino]benzoyl)amino]pentanediová) (Rajagopalan et al. 2002). Historicky prvními substráty identifikovanými jako substráty ABCG2 byla cytostatika daunorubicin, doxorubicin a rhodamin 123 (Doyle, Yang, et al. 1998). Později se ovšem ukázalo, že daunorubicin a rhodamin 123 je přenášen pouze transportérem s jednobodovou záměnou R482G/T (Robey et al. 2003). Mitoxantron je také cytostatikum, které je transportováno prostřednictvím ABCG2, přičemž transport metotrexátu je zřejmě kompetitivně inhibován mitoxantronem (Volk and Schneider 2003; Ifergan et al. 2004). Z dalších cytostatik jmenujme preparáty sorafenib (4-[4-([4-chloro-3-(trifluoromethyl) phenyl]carbamoyl) amino]phenoxy]-N-methylpyridin-2-karboxamid), topotecan ((19S)-8-[(dimethylamino) methyl]-19-ethyl-7,19-dihydroxy-17-oxa-3,13-diazapentacyklohenikosa-1(21),2,4(9),5,7,10,15(20)-heptan-14,18-dion), sn-38 (7-Ethyl-10-hydroxy-kamptothecin) (Wilhelm et al. 2008; Line et al. 1999; Kawabata et al. 2001).

V porovnání s terapeuticky používanými sloučeninami jsou fyziologické substráty málo známé. ABCG2 transportuje estron sulfát, 17- β -estradiol sulfát, dehydro-epiandrosteron sulfát, 17- β -estradiol glukuronid, čili konjugáty steroidů, jejichž výskyt lze očekávat především v játrech, kde jsou v této formě vylučovány do žluče (Imai et al. 2003; Suzuki et al. 2003). Dalšími fyziologickými substráty jsou vitamíny jako je

kyselina listová (vitamín B9), riboflavin (vitamín B2) a menandion (vitamín K3) (Ifergan et al. 2004; van Herwaarden et al. 2007; Shukla et al. 2007). K zajištění redukčního prostředí v buňce významnou měrou napomáhá tripeptid glutathion. Ukázalo se, že glutathion je substrátem ABCG2 a je možné, že epiteliální a jiné buňky jej secernují, aby ve svém okolí pomohli zajistit alespoň částečně redukční prostředí (Brechtbuhl et al. 2010). ABCG2 transportuje z intracelulárního prostoru hem a další porfyriny, čímž může chránit buňku před jeho škodlivými metabolity (Desuzinges-mandon et al. 2010).

Vývoj inhibitorů ABCG2 je velmi důležitým farmakologickým tématem uvážíme-li jeho kruciální funkci v exportu cytostatik z nádorových buněk. Jedním z klinicky využitelných inhibitorů je látka KO143 (terc-butyl 3-[(2S,5S,8S)-14-methoxy-2-(2-methylpropyl)-4,7-dioxo-3,6,17-triazatetracyclo[8.7.0.03,8.011,16]heptadeka-1(10),11,13,15-tetraen-5-yl]propanoát) , která ovšem ve vyšší koncentraci inhibuje i jiné transportéry než ABCG2 (Allen et al. 2002; Weidner et al. 2015). V experimentální práci se významně uplatňuje specifický inhibitor Fumitremorgin C, který byl izolován z houby *Aspergillus fumigatus*. Pro klinické využití je tato látka díky své neurotoxicitě nevyužitelná (Rabindran et al. 1998, 2000).

2.5.3. Význam ABCG2 v ledvině

V ledvině se transportér ABCG2 vyskytuje převážně na kartáčovém lemu epiteliálních buněk proximálního tubulu (Huls et al. 2008). Zde je jeho exprese řízena receptorem pro antidiuretický hormon (arginin-vazopresin) a to tak, že při jeho vyloučení do krve z neurohypofýzy je tento receptor obsazen a dochází ke stimulaci exprese transportéru. Následkem toho dochází k vyšší exkreci xenobiotik do hypertoničtější moče (Taniguchi et al. 2016). Exocytóza ABCG2 je v ledvině (stejně tak ve střevních enterocytech) regulována parathormonem. Jeho vyloučení z příštitných tělísek způsobuje endocytózu ABCG2 z apikální membrány, což má za následek zvýšení koncentrace kyseliny močové v séru (Sugimoto et al. 2017). Stejně tak se zdá, že inzulin snižuje exocytózu ABCG2 na apikální membráně buněk proximálního tubulu (a naopak zvyšuje expresi transportéru URAT1). Při nadměrném snížení hladiny inzulinu v krvi se tedy snižuje clearance urátu do moči. (Toyoki et al. 2017). Kalcitriol, hormon, který reguluje resorpci vápníku a fosfátů v ledvině, má inhibiční vliv na transport prostřednictvím ABCG2. Dosavadní studie byla provedena pouze na úrovni buněčné kultury (Tan et al. 2018). Zatím ovšem není znám fyziologický význam těchto regulací.

ABCG2 je v ledvinách zřejmě zodpovědný za transport xenobiotik a metabolických odpadních produktů, což odpovídá předpokladu, že jde o protein účastnící se ochrany tkání před poškozením toxickými látkami. Do primární moči pomáhá z krve vylučovat četná xenobiotika, například 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methyl-amino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazol sulfát, 3-Methyl-1-fenyl-2-pyrazolin-5-on- sulfát, a další. Za povšimnutí stojí, že metabolity těchto léčiv jsou transportovány spíše ve své sulfátované podobě a nikoliv konjugované s glukuronidem (Mizuno et al. 2002, 2007). Byl zjištěn transport indoxyl sulfátu, což je jeden z metabolitů, který se hromadí v krvi a způsobuje chronické onemocnění ledvin. Naopak kyselina hippurová zřejmě není tímto proteinem transportována (Takada et al. 2018). Rovněž se zdá, že se ABCG2 podílí na vylučování derivátů pohlavních hormonů konjugovaných s glukuronidem, jako jsou etiocholanolon glukuronid a dihydrotestosteron glukuronid (Basit et al. 2019). Transportér v ledvinném epitelu se podílí také na eliminaci rtuťnatých iontů, které jsou ukládány především v ledvinách, ale i v jiných orgánech. Eflux Hg^{2+} iontů probíhá zřejmě prostřednictvím konjugátů se sloučeninami tvořících disulfidické můstky (Bridges et al. 2015). Transport tímto proteinem je blokován některými látkami, které se mohou vyskytovat v krvi, jako je již zmíněný hippurát, indol-3-acetát nebo kyneurát. Naopak oxalát, putrescein či kyselina cholinová neinhibují přenos látek prostřednictvím ABCG2 (Mutsaers et al. 2011). Hlavním fyziologickým substrátem v ledvinách se zdá být kyselina močová, urát. Stejně jako další substráty, ABCG2 secernuje urát na apikální membráně epitelálních buněk, tedy na jejich kartáčovém lemu (Woodward et al. 2009). Vyšší koncentrace kyseliny močové (více než cca 4,0 mM) inhibuje transport prostřednictvím ABCG2. Měřením enzymatické kinetiky byla zjištěna Michaelis - Menteovská konstanta $K_m = 8,24 \text{ mM}$ a maximální transportní rychlost $6,96 \text{ nmol/min}$ (Ichida et al. 2009). Na epitelálních buňkách proximálního tubulu tak zřejmě dochází nejen k reabsorpci, ale i k sekreci kyseliny močové. Na jejím transportu oběma směry se podílejí výše zmíněné transportéry.

2.5.4. Význam ABCG2 v dalších orgánech

2.5.4.1. Játro

U člověka nalézáme expresi ABCG2 na kanalikulární membráně hepatocytů (Fetsch et al. 2006). Mezi fyziologické substráty přenášené ABCG2 v játrech patří estrogen-1-sulfát či dehydroepiandrosteron, taurocholát, estradiol-17-D-glukuronid a další konjugované látky, přičemž vyšší je afinita k látkám s konjugovanou sulfonovou

skupinou (Suzuki et al. 2003). ABCG2 nemá zřejmě velký význam pro transport žlučových kyselin, neboť dochází v jejich přítomnosti k inhibici jeho ATPázové aktivity (Telbisz et al. 2013). Také 17- β -estradiol jak samotný, tak konjugovaný se sulfonovou skupinou spíše transport inhibuje (Imai et al. 2003). Z toho lze usuzovat, že ABCG2 má větší význam jako transportér přenášející xenobiotika, jako jsou nejrozličnější metabolity pocházející například z trávení potravy, jako je benzo-a-pyren, 2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazol(4,5)pyridin (PHiP), ochratoxin A či aflatoxin B1 (Pavek et al. 2005; van Herwaarden et al. 2006; Schrickx et al. 2006; Kranz et al. 2014).

2.5.4.2. Střevo

Transportér je zastoupen v epitelu po celé délce trávicí trubice, přičemž míra jeho exprese distálním směrem klesá. Největší zastoupení je v oblasti duodena (Gutmann et al. 2005). Eflux cizorodých látek probíhá směrem do lumen střeva. Byla zjištěna exkrece vitaminu B2 nebo feoforbidu A, což je metabolit vzniklý trávením chlorofylu, obsaženého v rostlinné stravě (Jonker et al. 2002; van Herwaarden et al. 2007). Nejlépe jsou transportovány xenobiotika konjugovaná se sulfonovou nebo glukuronovou skupinou (Adachi et al. 2005; Sesink et al. 2006). Naproti tomu přirozené součásti žluče, kyselina cholová nebo glykocholát jsou tímto proteinem transportovány výrazně méně. Na sekreci těchto žlučových kyselin se podílí jiné transportní proteiny (Telbisz et al. 2014). Důležitý je fakt, že kyselina močová je asi z jedné třetiny vylučovaná epitelem střeva, které tak tvoří hned po ledvinách další důležitou tkáň zajišťující její exkreci. Na tomto ději se podílí právě transportér ABCG2 (Hosomi et al. 2012).

2.5.4.3. Centrální nervová soustava

Endotel mozkových kapilár obsahuje na apikální membráně transportér ABCG2 a to jak u člověka tak i u jiných živočichů (Maliepaard et al. 2001; Fetsch et al. 2006; Yousif et al. 2007). Naopak ani neurony ani podpůrné gliové buňky tento transportér nesyntetizují (Aronica et al. 2005). Protein zde opět plní zřejmě funkci přenašeče xenobiotik, který doplňuje ochrannou funkci hematoencefalické bariéry. Potvrzena byla jeho významná funkce v efluxu cytostatik sorafenib či regorafenib. Koncentrace afatinibu v mozku stoupá pouze při vyřazení ABCG2 a současně i transportéru ABCB1, takže se zdá, že oba tyto transportéry pracují na mozkovém endotelu

komplementárně (Lagas et al. 2010; van Hoppe et al. 2017; Kort et al. 2015). Transportér je downregulován v přítomnosti B-amyloidu, což je peptid, který se vyskytuje při Alzheimerově chorobě. Je tedy možné, že degenerativní změny při této chorobě jsou způsobeny, kromě samotného účinku B-amyloidu, také poškozováním mozku škodlivými látkami, jejichž exkrece vlivem snížení funkce ABCG2 (a také dalších transportérů) selhává (Shubbar et al. 2018). Překvapivě zvýšení obsahu nekonjugovaného bilirubinu v plazmě má za následek snížení exprese ABCG2 na endotelu mozkových kapilár (Xu et al. 2016). ABCG2 byl také identifikován na epitelu plexus choroideus, kde zřejmě opět plní funkci exportéru xenobiotik (Maliepaard et al. 2001). U potkanů bez exprese ABCG2 byla zjištěna vyšší plazmatická koncentrace anestetika ketamin, které bylo těmito potkanům podáno. Tento jev opět naznačuje funkci ABCG2 jako exportéru cizorodých látek zpět do krve a tak podporuje funkci hematoencefalické bariéry (Ganguly et al. 2018).

2.5.4.4. Varle

Na tzv. hematotestikulární bariéře, tvořené Sertolliho, Leydigovými a myoidními buňkami, byla zaznamenána exprese ABCG2 (Fetsch et al. 2006). Transportér je u člověka exprimován v intersticiální tkáni, a to na endotelu krevních kapilár a vytváří tak možnost exkrece xenobiotik proniklých do tkáně varlat zpět do krve (Dankers et al. 2012). Jiní autoři detekovali transportér i na apikální membráně myoidních buněk (Bart et al. 2004). Při inhibici ABCG2 dochází k hromadění xenobiotik v Sertolliho buňkách (M. Hoque et al. 2015). Steroidní hormony testosteron, progesteron a androstenedion zřejmě inhibují export prostřednictvím ABCG2 (Dankers et al. 2012). Na druhou stranu transportér přenáší glukuronidované konjugáty etiocholanolonu a dihydrotestosteronu i když s nižší afinitou než transportéry rodiny MRP (Basit et al. 2019). Dále je transportér exprimován na apikální membráně spermatid ve stádiu VI až VIII, kde zřejmě tvoří komplex se sítí aktinových filament (prostřednictvím proteinů ARP3 a EPS8) a přispívá tak k průběhu apikální ektoplazmatické specializace spermatid (Qian et al. 2013).

2.5.4.5. Placentální tkáň

Další tkání, kde ABCG2 hraje roli transportéru xenobiotik je syncytiotrofoblast. U myši se nachází v labyrintu, kde transportuje substrát do lumen kapilár matčina krevního oběhu a tak redukuje přestup těchto látek do fetální krve (Ceckova et al. 2006; Zhang

et al. 2007). Obdobný závěr lze vyvodit i z transportní studie provedené na placentách potkana (Reznicek et al. 2016). ABCG2 má na svědomí rovněž přenos žlučových kyselin, jako je taurocholát, glykocholát a taurocholát-3-sulfát z plodu do mateřských tkání (Blazquez et al. 2012). Jako příklad regulace uveďme down regulaci ABCG2 prostřednictvím anandamidu, který stimuluje receptor CB2, který ve svém důsledku snižuje množství cAMP v epitelální buňce a prostřednictvím CREB transkripčního faktoru i expresi ABCG2. Při poruchách hladiny tohoto neurotransmiteru, anandamidu, tedy může docházet ve svém důsledku k oslabení detoxifikační funkce ABCG2 na epitelu placenty (Szilagyi et al. 2019). Také zde zřejmě dochází k transportu estron sulfátu a 17- β -estradiol sulfátu zpět do mateřského krevního oběhu, jak bylo ověřeno v in vitro pokusech s polarizovanými buňkami LLC-PK (Imai et al. 2003).

2.5.4.6. Fenotyp postranní populace

Známým substrátem ABCG2 je fluorescenční barvivo Hoechst 33342. Některé kmenové buňky jsou toto barvivo schopny aktivně vylučovat ze své cytoplazmy. Tyto buňky vykazují tzv. fenotyp postranní populace, který byl poprvé identifikován v myší kostní dřeni a jehož lze využít pro rychlou identifikaci tohoto subtypu kmenových buněk (Goodell et al. 1996). Exprese ABCG2 je nezbytná pro vznik této subpopulace kmenových buněk, která u jedinců s experimentálním knockoutem tohoto transportéru zcela chybí (S. Zhou et al. 2002). U hematopoetických kmenových buněk je výskyt této subpopulace dán pouze expresí ABCG2, u dalších typů kmenových buněk jsou to i jiné ABC transportéry (Scharenberg et al. 2017). Populace postranních kmenových buněk byla prokázána v tkáních plic, slinivky, zubní dřeni, čočky oka a srdci (Lechner et al. 2002; Summer et al. 2003; Martin et al. 2004; Oka et al. 2010).

2.6. Alelické varianty ABCG2 a jejich vliv na transport kyseliny močové v ledvině

Jak jsem uvedl výše, na reabsorbci kyseliny močové v proximálním tubulu se podílí řada transportérů. Jako první dva transportéry zásadní pro transport urátu byly objeveny URAT1, jehož defekt způsobuje u pacientů hypourikemii, tedy patologicky nízkou hladinu kyseliny močové v plazmě (Enomoto et al. 2002). Druhým zásadním transportérem je SLC2A9, známý jako GLUT9, u něhož byl rovněž prokázán vliv na sérovou hladinu urátu. Při defektu tohoto transportéru vzniká naopak hyperurikemie

(Döring et al. 2008). Další studie ukázaly, že na sérovou hladinu kyseliny močové má vliv i další transportér, a to sice ABCG2, jehož dysfunkce způsobená alelickými variantami se účastní na vzniku hyperurikemie a dny. Woodward identifikoval, že alelická varianta Q141K je významná pro vznik hyperurikemie a dny, a že přímo ovlivňuje transport urátu na modelu oocytů *Xenopus laevis* (Dehghan et al. 2008; Kolz et al. 2009; Woodward et al. 2009).

Dna je onemocnění charakterizované ukládáním krystalů kyseliny močové v kloubech. Vznik těchto krystalů je způsoben dlouhodobě zvýšenou hladinou kyseliny močové. Nesprávná funkce ABCG2 v ledvinách má vliv na rozvoj hyperurikemie, tedy zvýšené koncentrace kyseliny močové v plazmě. Studie provedená na Japonské populaci ukázala, že dysfunkce transportéru ABCG2 má na rozvoj hyperurikemie vyšší vliv než jiné environmentální faktory (například věk, alkoholismus nebo obezita) (Nakayama et al. 2014). Vyjma dny může hyperurikemie způsobovat hypertenzi, vznik močových kamenů a rozvoj dalších kardiovaskulárních a nefrologických onemocnění (Feig, Kang, and Johnson 2008)^{***}. Hyperurikemii můžeme z hlediska clearance kyseliny močové do moči dělit na nízkou renální exkreci (dále jen RUE) a přetížení ledvin (dále jen ROL). U zhruba deseti procent pacientů s dnou se vyskytuje právě poškození transportéru ABCG2 ze 75 % a víc. Snížení funkce ABCG2 na jednu čtvrtinu a méně přitom vede k ROL formě hyperurikemie, poškození funkce z poloviny a méně vede spíše k RUE typu hyperurikemie (Ichida et al. 2009; Matsuo et al. 2014).

2.6.1. Q141K (C421A, rs2231142)

Alelická varianta Q141K byla popsána Deghanem et al. a způsobuje zvýšení hladiny urátu v séru a vznik dny (Dehghan et al. 2008; Phipps-Green et al. 2010; Yamagishi et al. 2010). *In vitro* provedený experiment na membránových váčcích ukázal, že tato varianta snižuje transport kyseliny močové přibližně na 50 % oproti wt variantě ABCG2. Je ale také možné, že varianta spíše ovlivňuje zacílení proteinu na apikální membránu. Expres této alelické varianty v buněčné kultuře buněk Flp-In-293 byla zhruba poloviční v porovnání s wild type variantou. Po aplikaci proteazomálního inhibitoru MG132 však tato hodnota vzrostla dvojnásobně. Tato skutečnost naznačuje, že za menší transportní kapacitou stojí degradace transportéru v proteazomu (Imai et al. 2002; Enomoto et al. 2002; Furukawa et al. 2009). Mutace také zřejmě ovlivňuje rozložení náboje na nukleotid vazebnou a transmembránové části transportéru, zřejmě

však neovlivňuje dynamiku transportu (László et al. 2016). Její výskyt v populaci se udává 11,9 % Ensembl.

2.6.2. V12M (G34A, rs2231137)

Tato mutace způsobuje, že nasyntetizovaný protein nezacílí na apikální membránu epitelální buňky, což pochopitelně snižuje secernaci kyseliny močové (případně jiného substrátu) do moči. ATPázová aktivita transportéru není touto mutací postižena. (Izuarai et al. 2004). Na základě studie pacientů s dnou v čínské populaci se zjistilo, že je u nich tato varianta zastoupena, ale spíše snižuje pravděpodobnost rozvoji dny. Nelze ji tedy použít k odhadu rizika jejího vzniku (na rozdíl od Q126 a Q141K) (D. Zhou et al. 2014). Výskyt v Japonské populaci činí 37,7 %. Varianta nemá vliv na samotný transport kyseliny močové (Ichida et al. 2009). Jedná se o alelickou variantu, která je v rámci populace ve vysoké frekvenci (Zamber et al. 2003; Kondo et al. 2004). V populaci se objevuje v četnosti 15,8 % Ensembl

2.6.3. Q126X (C376T, rs72552713)

Poprvé byl tento polymorfismus identifikován v Japonské populaci, jako haplotyp, ve kterém není ABCG2 vůbec exprimován, neboť na pozici Q126 je vsazen místo glutaminu stop kodon (Imai et al. 2002). Pozdější studie ukázaly, že tato varianta by se měla nalézat ve frekvenci v 5,5 % v Japonské populaci (Ichida et al. 2009). Také v populaci Koreje byla tato varianta identifikována (u 1,9 % probandů) (Lee et al. 2007). Mutace Q126X je také spřažena s tzv. Junior krevním antigenem v Asijské populaci (Junior antigen přítomný na erytrocytech způsobuje hemolytickou anemii např. při transfuzích) (Saison et al. 2013). V Japonské populaci Junior - antigen pozitivních jedinců je varianta Q126X zastoupena v 80 % případů (Tanaka et al. 2018). Na membránových váčcích bylo ukázáno, že tato varianta zcela eliminuje transportní schopnost ABCG2 pro kyselinu močovou (Ichida et al. 2009). Haplotyp Q126X významně zvyšuje riziko vzniku dny svého nositele (R. Li et al. 2015).

2.6.4. T153M (C458T, rs753759474)

Objevena byla v roce 2004 ve vzorcích mRNA z třiceti buněčných linií rezistentních k cytostatikům. Naopak u zdravých jedinců příslušejících ke kavkazské populaci se varianta nevyskytuje Mizuarai et al. 2004. Záměna na této pozici se nachází v nukleotid vazebné doméně ABCG2 a mohla by tak ovlivňovat vazbu nebo hydrolýzu ATP.

Varianta se vyskytuje u českých pacientů s dnou, ovšem průkaz její souvislosti se vznikem onemocnění na modelu *in vitro* dosud chybí (Stiburkova et al. 2017).

2.6.5. S476P (nepopsána)

Záměna S476P byla nalezená u Českých pacientů s dnou. Nachází se na spojovacím linkeru mezi druhou a třetí transmembránovou smyčkou. Vliv varianty na transport urátu zatím není znám (Stiburkova et al. 2017). Recentní publikace Zámbo et al. (2009) uvádí snížení ATPázové aktivity a současně signifikantní snížení transportu barviva Hoechst 33342.

2.6.6. R147W (C439A, rs372192400)

Tato varianta nalezená v české kohortě pacientů s dnou, ale stejně jako u alelické varianty T153M chybí experimentální průkaz její přímé souvislosti s hyperurikemií. Záměna nabitého argininu za tryptofan by mohla ovlivňovat vazbu nebo hydrolýzu ATP na nukleotid vázající doménu ABCG2 (Stiburkova et al. 2017). Opět jako u předchozí varianty byla v současnosti potvrzena nulová exprese takto mutovaného transportéru na membráně buněk a z toho plynoucí signifikantně nulová transportní kapacita (Zámbo et al. 2019).

2.6.7. D620N (G1858A, rs34783571)

Výskyt varianty D620N byl potvrzen u náhodného vzorku pocházejícího z devadesáti etnických skupin ve frekvenci 1,1 %. Záměna se vyskytuje na extracelulární smyčce před začátkem poslední transmembránové šroubovice (Honjo et al. 2002). Na apikální plazmatické membráně je tato alelická varianta exprimována ve větší míře (asi 2,4 x více) v porovnání s wt, ale transportní kapacita pro mitoxantron je snížena na 50 % (Vethanayagam et al. 2005). Naopak u jiných buněčných linií transfekovaných ABCG2 s touto variantou se uvádí snížená exprese na membráně a horší transportní kapacita (Yoshioka et al. 2007). Naproti tomu Morisaki et al. uvádí nezměněný transport mitoxantronu u této varianty (Morisaki et al. 2005). Výskyt byl rovněž popsán v kohortě pacientů trpících dnou a stejně jako u předchozích variant se předpokládá snížená schopnost transportovat urát. Nicméně stejně jako u předchozích variant nebyla experimentálně prokázána možná korelace mezi touto variantou a výskytem dny (Stiburkova et al. 2017).

2.6.8. F373C(T1118A, rs752626614), T434M (C1301T, rs769734146)

Tato alelická varianta byla popsána u skupiny pacientů z České republiky trpících dnou a dosud u ní nebyla experimentálně prokázán vliv na rozvoj hyperurikemie a dny (Stiburkova et al. 2017). Zatím není k vlivům této varianty na transporter ABCG2 nebo klinický stav pacientů dostatek jiných dat. Varianta T434M se nachází na první extracelulární smyčce spojující první a druhý transmembránový α -helix, kde nahrazuje polární threonin za hydrofobní methionin. Varianta F373C se nachází na polypeptidovém linkeru spojujícím nukleotid vázající a transmembránovou doménu transportéru. Obě záměny snižují transport barviva Hoechst 33342, přičemž T434M dokonce zvyšuje ATPázovou aktivitu (F373C ji nemění) (Zámbó et al. 2019).

2.6.9. K360del (rs750972998)

Varianta K360del představuje delecii tří nukleotidů kódujících lysin v polypeptidovém linkeru spojující nukleotid vázající a transmembránovou podjednotku ABCG2. Jelikož se lysin 360 nachází v polypeptidovém řetězci velmi blízko místu s další jednoaminokyselinovou záměnou (F373C), dá se očekávat obdobný vliv. Vzhledem k tomu, že jde o delecii jedné aminokyseliny je možné, že efekt na transport bude minimální. Její výskyt byl rovněž popsán u českých pacientů s dnou (Stiburkova et al. 2017). V rámci globální populace se udává hodnota 0,0107 % Ensembl.

2.6.10. I206L (A616C)

Alelická varianta I206L byla objevena na základě celogenomové studie u jedenácti různých populací (Zamber et al. 2003). Varianta vykazuje sníženou expresi na apikální membráně buněk. Naopak transportní schopnosti proteinu (pro cytostatika mitoxantron a metabolit feoforbid A jsou vyšší než u divoké varianty (Vethanayagam et al. 2005). Souvislost s rozvojem hyperurikemie a dny zatím nebyla testována.

2.6.11. K86M

U této varianty dochází zcela k potlačení transportu i ATPázové aktivity a transportér se stává zcela nefunkčním. Záměna lysinu za methionin se odehrává v katalytickém místě (Özvegy et al. 2002). Při transfekci do buněk se ukázalo, že protein s touto

mutací je zacílen do Golgiho aparátu, čemuž odpovídá nižší celkové proteosyntéze. Transport Hoechst 33342 je signifikantně snížen (Henriksen et al. 2005; Zámbo et al. 2019).

2.6.12. M71V

Tento haplotyp se vyskytuje přibližně u 1 % maďarské populace a způsobuje přibližně poloviční expresi ABCG2 na membránách červených krvinek. Protein s touto mutací má zachovanou jak glykosilaci, tak i transportní funkci. U homozygotů může tato varianta přispět ke vzniku dny (Zámbo et al. 2018).

3. Cíle diplomové práce

Na základě spolupráce s Revmatologickým ústavem při 1.lékařské fakultě univerzity Karlovy jsem testoval *in vitro* tyto alelické varianty transportéru ABCG2: V12M, Q141K, R147W, T153M, delece K360, F373C, T434M, S476P, S572R, D620N.

Cílem diplomové práce bylo otestovat hypotézu, že výše uvedené alelické varianty způsobují vznik hyperurikemie, případně dny na základě snížené schopnosti proteinu ABCG2 transportovat v proximálním tubulu kyseliny močovou z krevního pólu do primární moči, popřípadě jí secernovat do lumen střeva. Jako testovací model jsem zvolili nematurované oocyty žáby *Xenopus laevis* s arteficiálně exprimovaným proteinem ABCG2 s vnesenými alelickými variantami. Všechny testované varianty byly identifikovány pomocí celogenomových studií provedených na populaci 250 českých pacientů s hyperurikemií a dnou.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Kit pro transkripci *in vitro* - mMessage mMachine kit T7 - Invitrogen AM1344.
Oligem řízená mutagenese - Geneart site directed mutagenesis kit - Invitrogen A13282. Chemokompetentní bakterie DH5 α - Thermo 18265017.
Blotovací PVDF membrána - Immobilon P transfer membrane 7x8,4 cm Millipore.
Akrylamid ve směsi bis-akrylamid 30 % (29:1) - Sigma A3574.
Laemly pufr 2x koncentrovaný - Sigma S3401-1VL.
Pevná půda pro kultivaci bakterií - Oxoid nutrient agar CM0003.
Tekutá půda pro kultivaci bakterií Oxoid tryptose phosphate broth CM0283.
Kit pro izolaci plazmidů - Promega pureyield plasmid miniprep A1222.
Kit pro izolaci plazmidů ve velkém objemu - Hipure plasmid filter maxiprep kit Invitrogen K210016.

4.2. Plazmidy, oligonukleotidy a chemikálie

ABCG2 - plazmid pCMV6-AC ABCG2, Origene SC320948
URAT1 - plazmid pcDNA3 CMV SLC22A12, Invitrogen.
Primery - IDT Integrated DNA technologies, Leuven, Belgie.
Restrikční endonukleázy EcoR1 a Xho1 - Fast digest, ThermoFisher.
DNA marker Gene Ruler 1 kb DNA ladder - Thermo Scientific.
Ampicilin - zásobní vodný roztok o koncentraci 100 mg/ml.
Kolagenáza z *Clostridium histolohicum*
Sigma Protease Inhibitory Coctail - Sigma Aldrich P8340-1ML.
Primární protilátka proti ABCG2 (králík) D5V2K Cell signaling.
Primární protilátka proti β -aktinu (myš) 8H10D10 Cell signaling.
Primární protilátka proti SLC22A12 (králík) HPA 024575 Sigma.
Sekundární králičí protilátka proti myším protilátkám s konjugovanou křenovou peroxidázou A90-117P Bethyl.
Sekundární kozí protilátka proti králičím protilátkám s konjugovanou křenovou peroxidázou A9169-2ml Sigma
Chemiluminiscenční substrát Westar Supernova.
Scintilační koktejl Ultima Gold.
Izotopy - Uric acid ^{14}C MC1394, Hartman Analytic, Německo.

Anestetikum MS-222 (Trikain methansulfonát) Sigma - Aldrich.

Ostatní chemikálie - Sigma-Aldrich spol. s r.o. Praha,
Penta - Ing.Petr Švec spol s r.o. Praha

4.3. Přístroje

Vertikální proteinová elektroforéza Hoefer.

Blotovací přístroj systému semi-dry Hoefer Semiphore.

PCR cykler BioER XP cycler.

Scintilační počítač Perkin Elmer A290001 .

Mikroinjektor Narishige IM-400.

Chemiluminiscenční snímač Fujifilm LAS 4000.

Chladnička s teplotou 16°C (vinotéka).

Teplovzdušná třepačka IKA KS - 3000i.

Spektrofotometr Nanodrop ND - 1000.

Jehlový sonikátor Hielscher UP50H.

Ostatní běžné laboratorní přístroje (centrifuga, termoblok, vortex, vodní lázeň, mraznička, chladnička, pipety a pod.).

4.4. Roztoky

OR-2 – 82,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,0 mM MgCl₂; 5,0 mM HEPES. pH = 7,6.

ND-96 – 96,0 mM NaCl; 2,0 mM KCl; 1,8 CaCl₂; 1,0 mM MgCl₂; 5,0 mM HEPES,
1,0 mM pyruvát sodný. pH = 7,6.

TBE – 89,0 mM Tris; 89,0 mM H₃BO₄; 2,0 mM EDTA. pH = 8,3.

PBST – 137,0 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 KH₂PO₄, 0,1% Tween 20.
pH = 7,3.

4.5. Metody

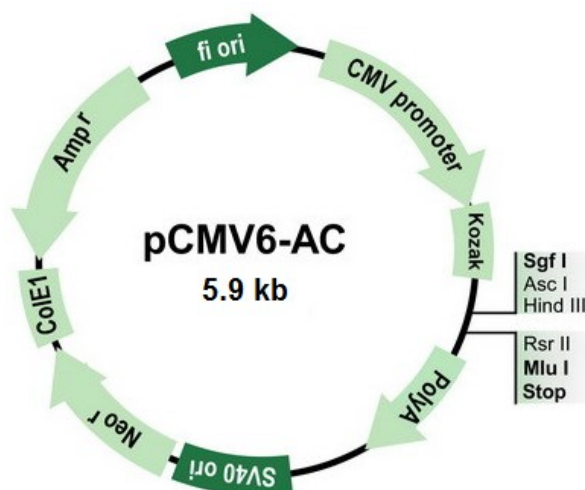
4.5.1. Oligonukleotidem řízená mutagenese

Vektor pCMV6-AC (obr. 4) s genem ABCG2 jsem za použití kitu Invitrogen Geneart site directed mutagenesis a primerů podrobil mutagenačnímu PCR. Primer R (reverse)

jsem vždy přidal až po proběhnutí dvou cyklů. Složení mutageneční PCR (identická pro všechny alelické varianty) reakce:

DMSO	1,5 µl
MgSO ₄	0,3 µl
Pufr	5,0 µl
Enhancer	5,0 µl
Primer F+R	1,5 µl každý
Plasmid	1,0 µl
25x SAM	2,0 µl
H ₂ O	30,8 µl
Methylasa	1,0 µl
Accuprime Pfx polymerase	0,4 µl

Celkem: 50 µl



Obr. 4 Vektor pCMV6-AC nesoucí gen ABCG2. Převzato z podkladů firmy Origene.

Použil jsem primery s následujícími sekvencemi (tab. 1). Všechny primery jsou komplementární k cílové sekvenci a obsahují zároveň žádanou jednobodovou záměnu (v případě varianty delK360 je kódující triplet v primeru vynechán). Koncentrace každého primeru je 10,0 µM.

Varianta	Forward	Reverse
V12M	5'- TCGAAGTTTTTATCCCAATGTCA CAAGGAAACACC-3'	5'- GGTGTTCCTTGTGACATTGGGATA AAACTTCGA-3'
Q141K	5'- CGGTGAGAGAAAACCTAAAGTTC TCAGCAGCTCTT-3'	5'- AAGAGCTGCTGAGAACTTTAAGTTT TCTCTCACCG-3'
R147W	5'- ACAGTTCTCAGCAGCTCTTTGGC TTGCAACAACATGAC-3'	5'- GTCATAGTTGTTGCAAGCCAAAGAG CTGCTGAGAACTGT-3'
T153M	5'- GCTTGCAACAACATGATGAATC ATGAAAAAACG-3'	5'- CGTTTTTTTCATGATTCATCATAGTT GTTGCAAGC-3'
del K360	5'- GCGGAGATTTAGAAGAAGAAGAT CACAGTCTTCAAGGAG-3'	5'- GCTGATCTCCTTGAAGACTGTGATC TTCTTCTTCTAAATCTCC-3'
F373C	5'- GATCAGCTACACCACCTCCTGCT GTCATCAACTC-3'	5'- CCCATCTGAGTTGATGACAGCAGG AGGTGGTG-3'
T434M	5'- GGGGTTCTCTTCTTCCTGATGAC CAACCAGTGTTCAGC-3'	5'- GCTGAAACACTGGTTGGTCATCAG GAAGAAGAGAACCCC-3'
S476P	5'- CTTATTTCTTGGAAAACGTGTTAC CTGATTTATTACC-3'	5'- CCTCATGGGTAATAAATCAGGTAAC AGTTTTCC-3'
S572R	5'- GGTAAAGCAGGGCATCAATCTCT CACCTGG-3'	5'- GCCCCAGGGTGAGAGATTGATGCC CTGCTTTAC-3'
D620	5'- TGGTAAAGCAGGGCATCAATCTC TCACCCTGGGGC-3'	5'- GCCCCAGGGTGAGAGATTGATGCC CTGCTTTACCA-3'

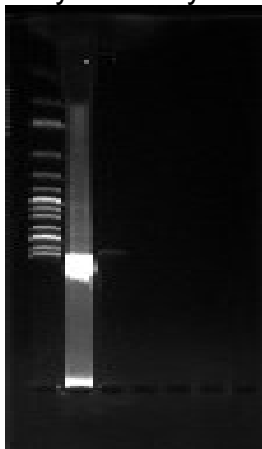
Tab.1 . Primery použité pro oligonukleotidem řízenou mutagenezi (mutagenační PCR) alelických variant ABCG2

Mutageneční PCR jsem pro všechny varianty provedl s následujícím programem (tab.2).

Teplota	Délka trvání	Opakování
37°	20 minut	1
94°	2 minuty	1
94°	20 sek	18
56°	30 sek	
68°	5 min	
68°	5 minut	1
4°	stále	1

Tab. 2. Program pro mutagenační PCR reakci.

Úspěšnost PCR jsem ověřil elektroforézou s 0,8% agarozovým gelem a pufrem TBE, při napětí 7 V/cm, obsahujícím ethidium bromid. V případě správně provedené PCR byl na gelu viditelný dobře vyznačený proužek (Obr. 5).



Obr.5. Příklad úspěšně provedené mutagenese (varianta V12M).
MarkerGeneruler 1kb DNA ladder, 0,8% agarozový gel.

Amplifikovaný plazmid, nesoucí gen ABCG2 s mutací jsem cirkularizoval pomocí rekombinační reakce podle protokolu přiloženému ke kitu Invitrogen Geneart site directed mutagenesis. Složení reakce bylo následující:

5x Reaction buffer	4 μ L
PCR voda	10 μ L
PCR vzorek	4 μ L
10x Enzymer mix	2 μ L

Po smíchání jsem reakci inkuboval 10 minut při laboratorní teplotě a poté ji zastavil přidáním 1 μ L 0,5 M EDTA. Ihned jsem přistoupil k transformaci bakterií.

4.5.2. Transformace bakterií a izolace pDNA z klonů

Cirkularizovaný plazmid nesoucí gen s danou alelickou variantou jsem použil pro transformaci bakterií DH5 α (INVITROGEN), podle protokolu dodaného výrobcem. Na ledu jsem roztavil zkumavku s 50 μ L kompetentních bakterií DH5 α - T1. Rozmrazování trvalo vždy 7 minut.

1. K bakteriím jsem přidal 2 μ L produktu rekombinační reakce a nechal zkumavku inkubovat 12 minut na ledu.
2. Provedl jsem transformaci ve vodní lázni o teplotě 42°C po dobu 30 vteřin.
3. Poté jsem uložil zkumavku ihned zpátky do ledu na 2 minuty.

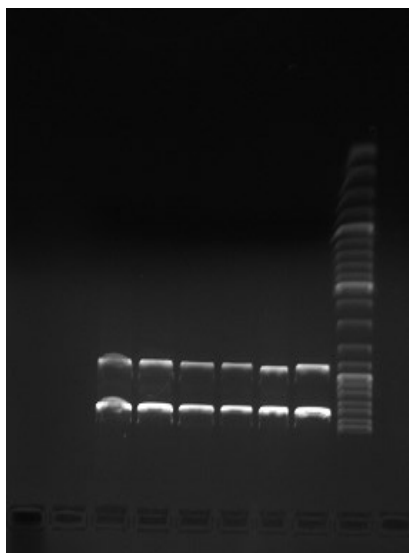
4. K takto transformovaným bakteriím jsem přidal 250 μ L SOC média a nechal bakterie inkubovat v bločku při 37°C po dobu 60 minut a 1250 kmitech za minutu.
5. Po inkubaci jsem 30 μ L suspenze bakterií vysel na misku s ampicilinem (200 μ L zásobního roztoku ampicilinu na 100 ml půdy).
6. Plotnu s vyšetými bakteriemi jsem nechal inkubovat přes noc při 37°C.

Druhý den jsem přeočkoval 5 až 10 transformantů na záložní plotnu a zároveň zaočkoval do 2,0 až 3,0 ml tekuté půdy TPB (triphosphate broth). Záložní plotnu jsem inkuboval v termostatu při 37°C přes noc. Tekutou půdu jsem inkuboval ve třepačce při 37°C přes noc při 180 kmitech za minutu.

Narostlé transformanty (klony) jsem druhý den z tekuté půdy použil pro izolaci plazmidů pro restrikční analýzu a sekvenaci. Izolaci plazmidů jsem provedl alkalickou metodou s vazbu plazmidové DNA na kolony firmy Quiagen podle protokolu níže.

4.5.3. Restrikční analýza

Vyizolovaný plazmid z jednotlivých klonů, kterých bylo 5 až 10 pro každou variantu jsem podrobil restrikční analýze s využitím restrikčních endonukleáz EcoR1 a Xho1. Restrikcí jsem v optimálním případě získal dva fragmenty: vektor o velikosti asi 8 kbp a inzert ABCG2 o velikosti 2,2 kbp. Pokud velikost obou fragmentů odpovídala těmto hodnotám, tak jsem daný klon použil v dalších krocích a odeslal z něj izolovaný plazmid na sekvenaci. V případě, že velikosti inzertu a vektoru neodpovídala těmto velikostem, jsem dané klony vyřadil z dalšího postupu jako nevhodné. Naštěpenou DNA jsem analyzoval na 0,8% agarozovém gelu s TBE pufrem, barvený ethidium bromidem (příklad na obr.6). Koncentraci pDNA jsem změřil spektrofotometricky na přístroji Nanodrop při 260 nm. Plazmid pcDNA3 nesoucí wt variantu URAT1 jsem měl k dispozici řádně amplifikovaný se správnou sekvencí již z předchozího projektu.



Obr. 6. Příklad restrikční analýzy alelické varianty Q141K. Restrikční štěpení endonukleázami EcoR1 a Xho1. Agarozový gel 0,8 % s puforem TBE, barvený ethidium bromidem.

4.5.4. Sekvence pDNA

Klony, které uspěly v restrikční analýze, jsem odeslal na sekvenaci pro zjištění přesného sledu bazí v sekvenci. Sekvenaci provedla Laboratoř sekvenace PŘF UK. Pro sekvenaci jsem gen rozdělil primery pokrývajícími celý gen ABCG2 s přesahem do promotorové a 3' UTR oblasti. Primery jsou navrženy tak, aby se z nich čtené sekvence vzájemně překrývaly. V tabulce 3 uvádíme sekvenci sekvenačních primerů o koncentraci každého 5,0 μ M.

Primer	Sekvence
442R	5'-CTCAGGATCTCAGGATGCGTGC-3'
557F	5'-CGACAGCTTCCAATGACCTG-3'
946R	5'-AGTTGTTGCAAGCCGAAGAG-3'
1435F	5'-GCCACAGAGATCATAGAGCCT-3'
1791R	5'-AGGAAGAAGAGAACCCCAGC-3'

Tab. 3. Sekvence sekvenačních primerů. Písmeno F za číslem v názvu značí forward primer, písmeno R reverse primer.

Sekvenační reakce obsahovala vždy 200 ng plazmidové DNA. Složení sekvenační reakce uvádím níže (tab.4):

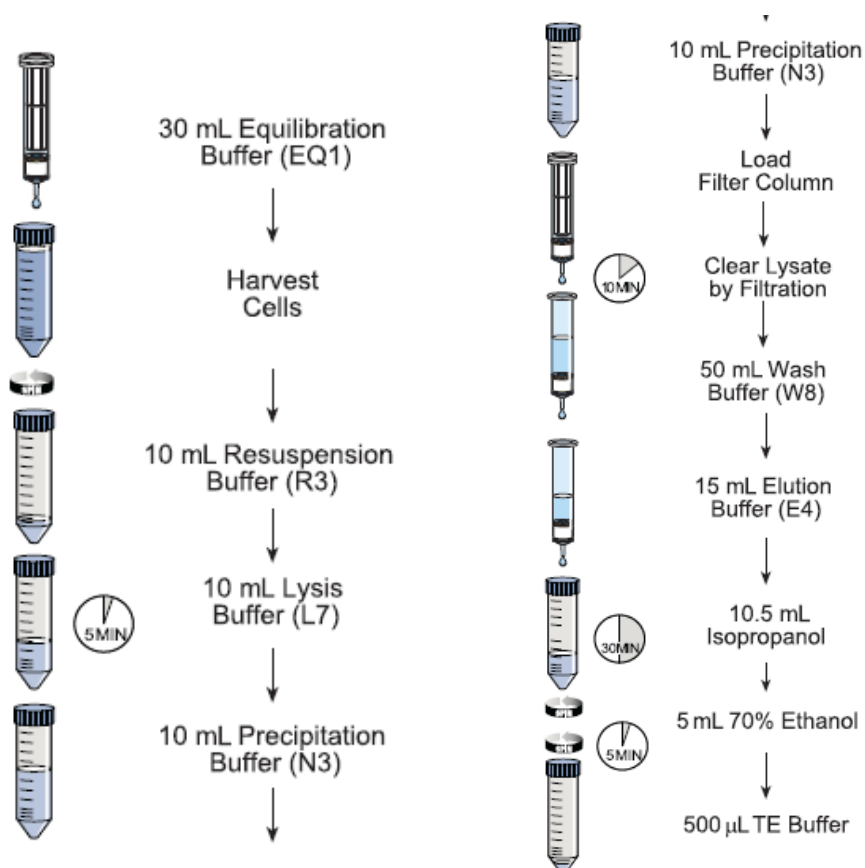
Složka	Objem (μL)
PCR voda	6,0
Primer	1,0
plazmidová DNA	1,0

Tab.4. Složení sekvenační reakce

Z klonů, jejichž sekvence odpovídala sekvenci uvedené v databázi a zároveň nesoucích požadovanou mutaci, jsem vybral jeden, který byl dále amplifikován pro následné experimenty..

4.5.5. Izolace pDNA z cílového klonu

V 200 ml tekuté půdy TPB s přidaným ampicilinem (200 μL zásobního roztoku na 100 ml půdy) jsem namnožil vybraný klon se správnou sekvencí. Ze záložní plotny s ampicilinem jsem daný klon přenesl buď rovnou do 200 ml půdy anebo nejprve na 4 hodiny do 2 až 3 ml půdy TPB a takto aktivované bakterie jsem přeočkoval do 200 ml TPB půdy. Zaočkovanou půdu jsem inkuboval přes noc při 37°C na třepačce při 180 kmitech za minutu. Druhý den jsem vyizoloval plazmid alkalickou metodou za použití kolonek Hipure plasmid filter maxiprep kitu. Protokol výrobce uvádím na obrázku 7.



Obr. 7 . Schéma alkalické izolace plazmidové DNA pomocí Hipure plasmid filter maxiprep kitu. Převzato z manuálu firmy Thermofisher.

Koncentraci pDNA jsem změřil spektrofotometricky na přístroji Nanodrop při 260 nm.

Tabulka 5 uvádí koncentrace DNA jednotlivých klonů.

Varianta	Koncentrace (ng/ µl)
WT	841
S572R	404
Q141K	1955
D620N	1273
T434M	1205
T153M	311
V12M	219
F373C	1934
S476P	1082
R147W	269
delK360	307

Tab.5. Koncentrace pDNA jednotlivých alelických variant ABCG2.

4.5.6. Sekvenace

Pro verifikaci sekvence cílového klonu namnoženého ve velkém množství jsem plazmid z tohoto klonu odeslal na sekvenaci. Sekvenace byla provedena za shodných podmínek jako u plazmidů izolovaných z jednotlivých klonů (viz výše).

4.5.7. Transkripce *in vitro*

Plazmidovou DNA v množství 4,0 µg jsem linearizoval restrikční endonukleázou *Kas1* při 37°C 1 hodinu. Reakci jsem zastavil 2 µl 0,5M EDTA. Následně jsem plazmidovou DNA přečistil přes kolonu Fermentas PCR purification kit. K Transkripci *in vitro* jsem využil kit T7 mMessage mMachine. Do reakce jsem vložil vždy 1,0 µg linearizované plazmidové DNA dané varianty. Složení reakce uvádím níže (tab.6).

Složka	Objem (µL)
Lineární pDNA	1000 ng
NTP/CAP	10,0
Pufr	2,0
Enzym mix	2,0
DEPC voda	ad 20,0

Tab.6. Složení reakce pro *in vitro* transkripci kitem T7 mMessage mMachine kit.

Transkripci jsem prováděl 2 hodiny při 37°C. Po proběhnutí jsem do reakce přidal 30 µL chloridu lithného a 30 µL DEPC vody. mRNA se srážela přes noc při teplotě -20°C. Druhý den jsem centrifugací (20 minut 15000g, 4°C) oddělil peletu mRNA a tu jsem promyl ve 100 až 200 µl 70% etanolu. Po promytí jsem vzorek znovu centrifugoval 10 minut 15000 g při 4°C, odlil ethanol a nechal schnout 10 minut při 37°C. Připravenou mRNA jsem rozpustil ve 20 µl DEPC ošetřené vody a uskladnil při teplotě -80°C.

4.5.8. Odběr oocytů z *X.laevis* v celkové anestezii

Samici žáby *X.laevis* o stáří 2 - 5 let jsem anestezioval v 0,125% roztoku MS-222 po dobu 20 minut. Dostatečnou hloubku anestezie jsem ověřil testováním ztráty reflexů. Žábu jsem uložil na ledovou tříšť na záda a provedl řez kůží a břišní svalovinou v oblasti levého nebo pravého podbřišku v délce asi 10 mm. Z břišní dutiny jsem

pinzetou vyjmul ovariální vak a po jeho odstřížení jsem jej ihned přenesl do média OR-2. Operační ránu jsem sešil vstřebatelnou chirurgickou suturou a žábu odložil na záda do čisté vody, kde jsem ji sledoval do nabytí vědomí (žába se reflexně otočí do přirozené polohy). Žábu jsem odložil na tři týdny do karanténní nádoby v centrálním chovu. Po zahojení operační rány byla žába vrácena do chovné nádoby.

4.5.9. Příprava oocytů

Ovariální vak jsem v roztoku OR-2 natrhal dvěma pinzetami a dvakrát promyl stejným médiem. Po odstranění nekrotických oocytů (s nejasně vyznačeným či skvrnitým animálním pólem) jsem je přenesl do roztoku čerstvého OR-2 s kolagenázou z *Clostridium histiolithicum* o koncentraci 1,7 mg/ml. V tomto roztoku jsem oocyty inkuboval do té doby, dokud se ovariální vaky samovolně nezačali rozpadat (obvyklá doba byla 1,5 až 2,0 hodiny při teplotě 16 °C). Uvolněné oocyty jsem několikrát opláchl OR-2 médiem s následnou 30-ti minutovou inkubací na kývačce. Oocyty jsem uchovával při 16°C. Poté jsem pod binolupou vyseletoval zdravé oocyty (s jasně vymezeným animálním a vegetálním pólem bez skvrn) ve stádiu VI podle (Demont 1972). Tyto oocyty jsem přenesl do kultivačního média ND-96 a uložil na led, kde setrvaly do mikroinjekce.

4.5.10. Mikroinjekce do oocytů a inkubace

Mikroinjekci jsem prováděl na mikroinjektoru Narishige IM-400. Oocyty jsem přenesl do Petriho misky se sítkou bránící jejich pohybu a skleněnou mikrokapilárou do nich injikoval 50 ng mRNA daného transportéru (URAT 1 a daná varianta ABCG2). Oocyty prasklé či nekrotizující jsem nahradil zdravými. Mikroinjekci jsem prováděl při pokojové teplotě. Mikroinjikované oocyty jsem kultivoval v médiu ND-96 48 hodin při teplotě 16°C.

4.5.11. Funkční studie s ¹⁴C značenou kyselinou močovou

Po dvoudenní inkubaci jsem oocyty prohlédl a zřetelně poškozené či nekrotické jsem odstranil. Oocyty jsem dál přechovával ve při teplotě 4°C. Následně jsem je opláchl médiem ND-96 a vložil je do média ND-96 s radioaktivně značeným urátem C14 o celkové koncentraci 600 μM (49,2 μM aktivního a 550,8 μM studeného urátu). Inkubace probíhala přesně 30 minut při pokojové teplotě. Po této době jsem oocyty

opláchl třikrát médiem ND-96 o teplotě 0°C (přechováno na ledu) k zamezení činnosti transportérů a oplachu izotopu adsorbovanému na membránu oocyty. Část oocytů jsem inkuboval ještě 10 minut v médiu ND-96 bez urátu při pokojové teplotě. Od každé alelické varianty v každé studii jsem využil 5 oocytů ve třech skupinách, a to ve dvou částech. Jedna část s inkubací 30 minut a oplachem a druhá s následnou 10 minutovou inkubací v médiu ND-96 (bez kyseliny močové). Po opláchnutí jsem oocyty přenesl do scintilační zkumavky a lyzoval přes noc 1,0 M NaOH (1,0 ml). Druhý den jsem lyzát zvortexoval a hydroxid sodný neutralizoval 0,5 ml 2M HCl. Ke zneutralizovanému lyzátu jsem přidal hydrofilní scintilační koktejl Ultima Gold v množství 3,0 ml.

4.5.12. Analýza aktivity radioaktivního urátu

Aktivitu vzorků jsem měřil scintilačním počítačem. Měření probíhalo 10 minut pro každý vzorek, přičemž v každé funkční studii jsem měřil i aktivitu pozadí a aktivitu roztoku urátu použitého ve funkční studii jako kontrolu. Při měření jsem využil program uhlík 14C s interní kalibrací na zhášení.

4.5.13. Příprava vzorků na imunodetekci a Western blot

Z každé funkční studie jsem odebral vzorky na Western blot od každé funkční varianty 10 oocytů. Oocyty jsem pipetováním zhomogenizoval ve 300 µl roztoku OR-2 s inhibítorem proteáz (Sigma Protease Inhibitory Cocktail) v množství 3,0 µl na jeden oocyt. Homogenát jsem nechal inkubovat 1 hodinu na ledu. Po jedné hodině jsem odstranil žloutková a pigmentová granula centrifugací při 250 g 15 minut 4°C. Poté jsem odebral supernatant a centrifugaci opakoval za stejných podmínek. Odebral jsem opět supernatant tak, abych nenasál peletu ani lipidickou vrstvu na hladině. Do supernatantu jsem přidal detergent Tween 20 o výsledné koncentraci 1,0 %. Takto připravený homogenát jsem upravil sonikací jehlovým sonikátorem UP50H po dobu 1 minuty. Vzorky jsem celou dobu držel na ledu. 100 µl lyzátu jsem smísil se 100 µl Laemly pufru 2x a přidal 1,0 M dithioteritol na konečnou koncentraci 50 µM. Takto připravené vzorky jsem denaturoval 60 minut při teplotě 56 °C v termobloku. Na akrylamidový gel (10 % dělicí a 5 % ostřicí gel) jsem nanášel 20 µl každého vzorku spolu s proteinovým markerem Spectra multicolor broad range protein marker. Provedl jsem standardní SDS-PAGE při 120 V (proud 20 mA) ve vertikální elektroforéze Hoefer. Po rozdělení proteinů na gelu jsem přenesl proteiny na PVDF membránu

Merck v blotovací aparatuře Hoefer při proudu 100 mA (napětí 5 V) po dobu 1 hodinu. Gel jsem pro kontrolu barvil 0,1 % Coomassie blue ve směsi methanolu a kyseliny octové 3:1 po dobu 20 minut a pak jej přes noc odbarvil roztokem metanolu a kyseliny octové 3:1. Membránu jsem opláchl v roztoku PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) po dobu 3x5 minut a dále ji blokoval 1,5 hodiny v 5 % BSA v PBST. Poté jsem membránu opláchl 3x 5 minut v PBST a následně inkuboval s danou primární protilátkou přes noc při 4 °C za kývání. Druhý den jsem odlil protilátku, promyl membránu 5 x 5 minut v PBST a následně inkuboval s danou sekundární protilátkou 1 hodinu při laboratorní teplotě. Protilátku jsem odlil a membránu opláchl v PBST 5 x 5 minut. Přehled protilátek použitých ve western blotu uvádí tabulka (tab 7).

Protilátka proti	Název (host)	ředění, rozpouštědlo
ABCG2	5D3 (králík)	1:1000, 5% BSA v PBST + 0,1% NaN ₃
Urat 1	HPA024575 (králík)	1:1000, 5% BSA v PBST + 0,1% NaN ₃
B-aktinin	8H10D10 (myš)	1:1000, 5% mléko v PBST + 0,1% NaN ₃
Myší protilátce (sekundární)	A90-117D (králík)	1:15000, 5% BSA v PBST
Králičí protilátce (sekundární)	A9169 (koza)	1:15000, 5% BSA v PBST

Tab.7. Přehled použitých protilátek pro imunodetekci na PVDF membráně (Western blot).

4.5.14. Imunodetekce na membráně

Na membránu jsem nanесl chemiluminiscenční substrát Westar Supernova (400 µl na membránu) ředěný 1 : 5 vodou. Chemiluminiscenční obraz jsem snímал buď na přístroji LAS 4000 nebo na film Agfa CP-BU při vhodné expoziční době (interval 20 sekund až 5 minut). Film jsem vyvolal ve vývojce Fotonal a ustalovači Fomafix.

5. Výsledky

Z organizačních důvodů jsem funkční studii rozdělil do dvou skupin, jež jsou přehledně uvedeny v tabulce 8.

První skupina	Druhá skupina
Neinjikované oocyty	Neinjikované oocyty
URAT1	URAT1
ABCG2 WT	ABCG2 WT
URAT1 + ABCG2 WT	URAT1 + ABCG2 WT
URAT1 + ABCG2 Q141K	URAT1 + ABCG2 del K360
URAT1 + ABCG2 R147W	URAT1 + ABCG2 S572R
URAT1 + ABCG2 T434M	URAT1 + ABCG2 V12M
URAT1 + ABCG2 S476P	URAT1 + ABCG2 F373C
URAT1 + ABCG2 D620N	

Tab. 8. Rozdělení alelických variant do skupin

5.1. Měření první skupiny alelických variant

Jako první jsem po mikroinjekci oocytů a jejich následné inkubaci 48 hodin v médiu ND-96 provedl funkční studii s radioaktivně značeným urátem C14. Jednalo se o neinjikované oocyty (N.I.), injikované pouze URAT1, injikované pouze WT ABCG2, URAT1 + WT ABCG2, a dále injikované URAT1 společně s alelickými variantami ABCG2 - Q141K, R147W, T434M, S476P, D620N. Uptake urátu neinjikovanými oocyty jsem měřil jako negativní kontrolu, uptake oocyty injikovanými transportérem URAT1 jako výchozí hodnotu pro stanovení množství urátu v cytoplazmě. Kombinace transportérů URAT1 a ABCG2 WT slouží jako pozitivní kontrola a zároveň srovnávací hodnota transportu urátu wt variantou ABCG2. Pro každou variantu jsem použil minimálně 5 oocytů a to celkem v šesti skupinách, které jsem inkuboval 30 minut v urátu 14C. Z těchto šesti skupin jsem tři ihned po této době opláchl vychlazeným ND-96 a přenesl do scintilační zkumavky. Další tři skupiny jsem nechal inkubovat deset minut v roztoku ND-96 po dobu deset minut, následně je opláchl ledovým ND-96 a přenesl do scintilační zkumavky. V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty DPM

(Desintegration Per Minute) pro každou variantu a každou skupinu, dále pak průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Hodnoty, které se výrazně odlišovali od ostatních jsem vypustil. Průměr je značen Av, směrodatná odchylka značena SD.

	H ₂ O		URAT1		URAT1+ABCG2 WT		URAT1+ABCG2 Q141K	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
DPM	247	193	2315	1704	780	952	1573	1094
	274	189	2208	1642	707	849	1331	1264
	212	236	1960	1717	739	788	1387	1204
Av	244,33	206,00	2161,00	1687,67	742,00	863,00	1430,33	1187,33
s	31,09	26,06	182,11	40,08	36,59	82,89	126,69	86,22

	URAT1+ABCG2 R147		URAT1+ABCG2 T434M		URAT1+ABCG2 S476		URAT1+ABCG2 D620N	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
DPM	1018	1142	1250	1069	1290	1497	973	831
	1058	1215	1339	985	2036	1214	1149	802
	1172	1170	1476	951	1303	1109	757	843
Av	1082,67	1175,67	1355,00	1001,67	1543,00	1273,33	959,67	825,33
s	79,91	36,83	113,85	60,74	427,00	200,69	196,34	21,08

Tab. 9. Výsledky měření aktivity 14C u první skupiny variant

5.2. Měření druhé skupiny variant

Zcela stejným způsobem jsem provedl měření aktivity 14C urátu v cytoplazmě oocytů tvořících druhou skupinu alelických variant. Jednalo se o neinjikované oocyty (N.I.), injikované pouze URAT1, injikované pouze WT ABCG2, URAT1 + WT ABCG2, a dále injikované URAT1 společně s alelickými variantami ABCG2 - delK360, S572R, V12M, F373C, T153M. V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty DPM (desintegration per minute) pro každou variantu a každou skupinu, dále pak průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Hodnoty, které se odlišovali o více než dvojnásobek směrodatné odchylky v dané skupině jsem vypustil.

	H ₂ O		URAT1 WT		URAT1+ABCG2 WT		URAT1+ABCG2 K360del	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
DPM	197	188	1467	1218	1339	0	911	1093
	187	154	1138	1240	1218	1076	959	749
	247	231	1316	1060	0	858	994	1133
Av	210,33	191,00	1307,00	1172,67	852,33	644,67	954,67	991,67
s	32,15	38,59	164,68	98,19	85,56	154,15	41,67	211,11

	URAT1+ABCG2 S572R		URAT1+ABCG2 V12M		URAT1+ABCG2 F373C		URAT1+ABCG2 T153M	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
DPM	1223	1132	1087	865	1232	673	820	905
	1081	887	1181	835	1094	929	1026	951
	1131	916	917	872	1120	1035	1003	950
Av s	1145,00	978,33	1061,67	857,33	1148,67	879,00	950,07	935,14
	72,03	133,87	133,81	19,66	73,33	186,11	112,90	26,24

Tab 10. Výsledky aktivity 14C u druhé skupiny variant

5.3. Celkové výsledky a statistika

Výsledky z obou funkčních studií jsem dále přepočítal tak, aby dávaly informaci o koncentraci kyseliny močové v oocyty po dané inkubační době. Skupiny s oocyty neinjikovanými, injikovanými URAT1 a URAT1 s ABCG2 WT jsem měřil celkem v šesti skupinách, ostatní varianty ve třech skupinách. Množství urátu uvádím jako látkové množství tedy v pmol. Pro výpočet jsem DPM převedl na Bq vydělením konstantou 60. Poté jsem ze známé aktivity 1 pmol urátu dopočítal látkové množství urátu n akumulované v cytoplazmě jednoho oocyty po dané délce inkubace. Ve výpočtu koncentrace jsem zohlednil i poměr aktivního k neaktivnímu (studenému) urátu. Výpočet tedy proběhl podle vzorce:

$$n[14C \text{ urát}] = \frac{DPM}{60 \cdot 0,153}$$

Kde konstanta 0,153 uvádí aktivitu 1 pmol urátu v Bq.

Tabulky 11,12,13 uvádí hodnoty množství urátu v oocyty pro danou variantu a danou skupinu oocytů, a to jak v každé sadě, tak i průměrnou hodnotu.

	H2O		URAT1		URAT1+ABCG2 WT	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
Množství urátu v oocyty pmol	5,36886	4,1951	50,319	37,039	16,9542895	20,693
	5,95574	4,1082	47,994	35,691	15,3675419	18,454
	4,60809	5,1298	42,603	37,321	16,0631025	17,128
	4,28204	4,0864	31,887	26,475	29,1048636	0
	4,06468	3,3474	24,736	26,953	26,4747751	23,388
	5,36886	5,0211	28,605	23,04	0	18,65
Av	4,94	4,31	37,69	31,09	17,33	16,39
SD	0,62	0,51	9,28	5,60	6,97	5,46

	URAT1+ABCG2 R147W		URAT1+ABCG2 T434M	
	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min
Množství urátu v oocyту	22,12752141	24,823	27,170336	23,236071
	22,99697215	26,41	29,104864	21,410225
	25,47490677	25,431	32,082732	20,671191
Av	23,53	25,55	29,45	21,77
SD	1,74	0,80	2,47	1,32

Tab 11. Hodnoty uptake urátu v oocyту pro neinjikované, injikované URAT1, URAT1 s ABCG2 WT, R147W, T434M.

	URAT1+ABCG2 S476P		URAT1+ABCG2 S572R		URAT1+ABCG2 F373C		URAT1+ABCG2 K360del	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
Množství urátu v oocyту	28,0397865	32,539	25,67698605	24,87	26,77908288	14,629	19,80174067	23,7577
	44,2550428	26,388	26,42810048	28,097	23,77947782	20,193	20,84508156	16,2805
	28,322358	24,106	20,53046122	18,055	24,3446208	22,497	21,60585096	24,6272
Av	33,54	27,68	24,21	23,67	24,97	19,11	20,75	21,56
SD	9,28	4,36	3,21	5,13	1,59	4,05	0,91	4,59

Tab 12. Hodnoty uptake urátu v oocyту pro URAT1 s ABCG2 S476P, S572R, F373C, del K360.

	URAT1+ABCG2 D620N		URAT1+ABCG2 V12M		URAT1+ABCG2 Q141K		URAT1+ABCG2 T153M	
	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96	14C	ND96
	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min	10 min
Množství urátu v oocyту	21,14938932	18,063	23,62732394	18,802	34,1911505	23,77948	17,83	19,67
	24,97497259	17,432	25,67053318	18,15	28,9309735	27,47464	22,31	20,67
	16,45435531	18,324	19,93215828	18,954	30,1482045	26,17047	21,81	20,64
Av	20,86	17,94	23,08	18,64	31,09	25,81	20,65	20,33
s	4,27	0,46	2,91	0,43	2,75	1,87	2,45	0,57

Tab 13. Hodnoty uptake urátu v oocyту pro URAT1 s ABCG2 D620N, V12M, Q141K, T153M.

Statistické ověření signifikance změny transportu pro danou variantu jsem provedl na základě vyhodnocení Studentova t-testu. Test jsem zvolil jednovýběrový, nepárový, předpokládáme normální rozdělení dat. Vypočtené hodnoty pravděpodobnosti p uvádím vypočtené v tabulce 14. Jednotlivé hladiny pravděpodobnosti jsem označil

* pro $p = 0,05$ a ** pro $p = 0,01$.

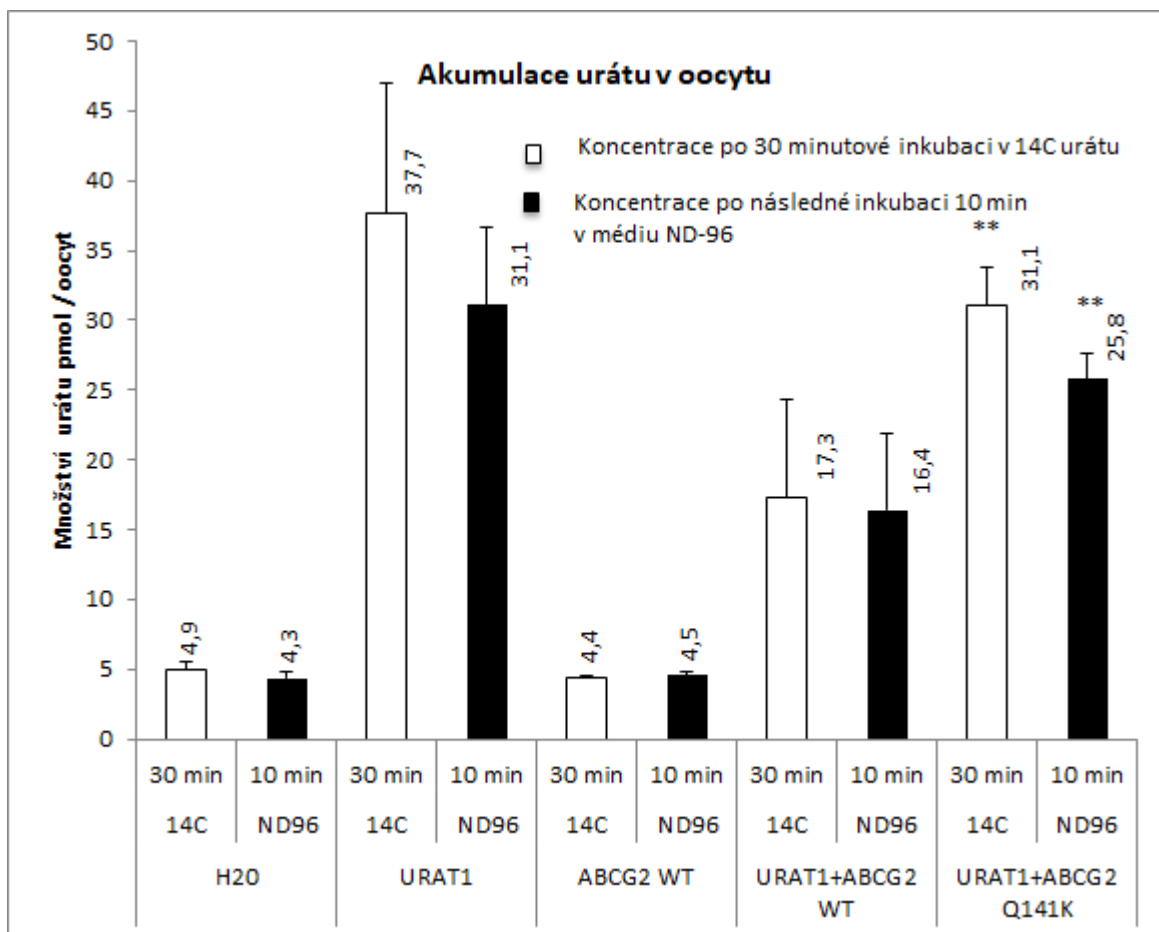
Hladina pravděpodobnosti p

Varianta	Inkubace 30 minut 14C urát	symbol	Inkubace 10 minut ND- 96	symbol
R147W	0,001281	**	0,001977	**
T434M	0,000444	**	0,039811	*
S476P	0,015878	*	0,015349	*
S572R	0,006667	**	0,096126	NESIG
F373C	0,000503	**	0,213769	NESIG
K360del	0,495857	NESIG	0,449022	NESIG
D620N	0,066052	NESIG	0,244048	NESIG
V12M	0,070961	NESIG	0,138026	NESIG
Q141K	0,000415	**	0,004665	**
T153M	0,019267	*	0,112026	NESIG

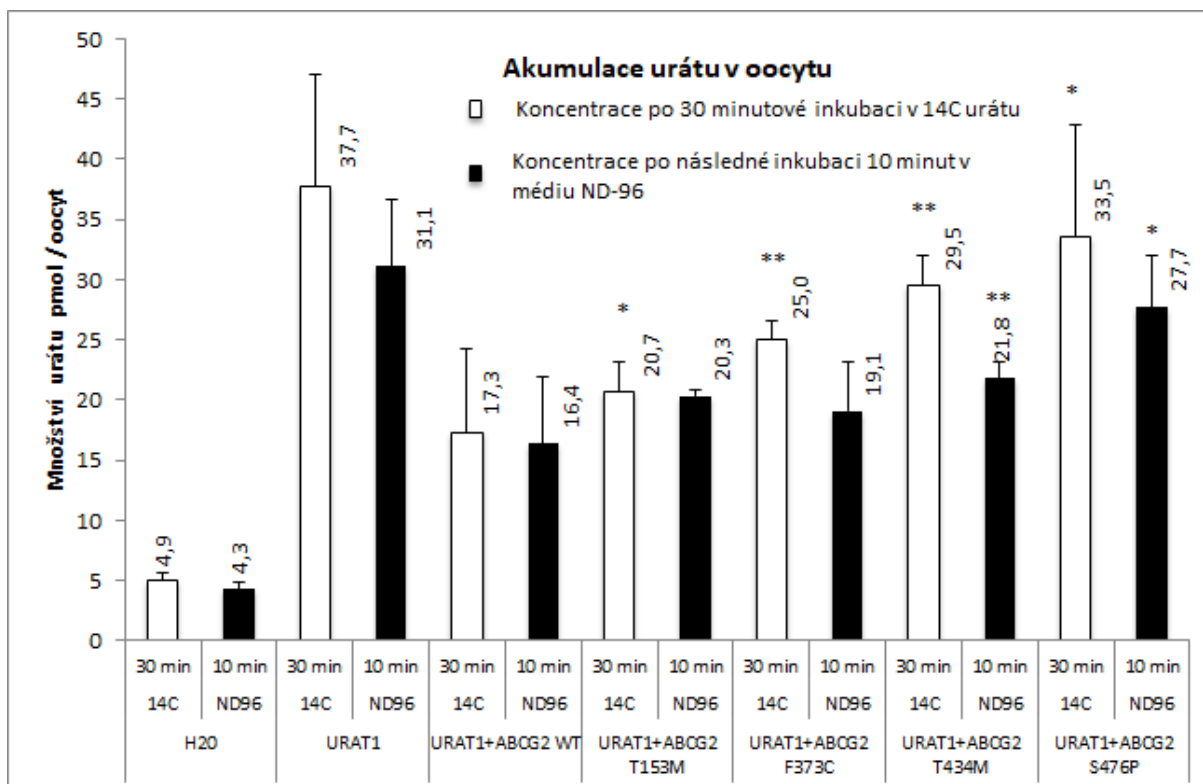
Pravděpodobnost $p = 5\%$ *Pravděpodobnost $p = 1\%$ **

Tab. 14. Statistické srovnání jednotlivých variant ABCG2

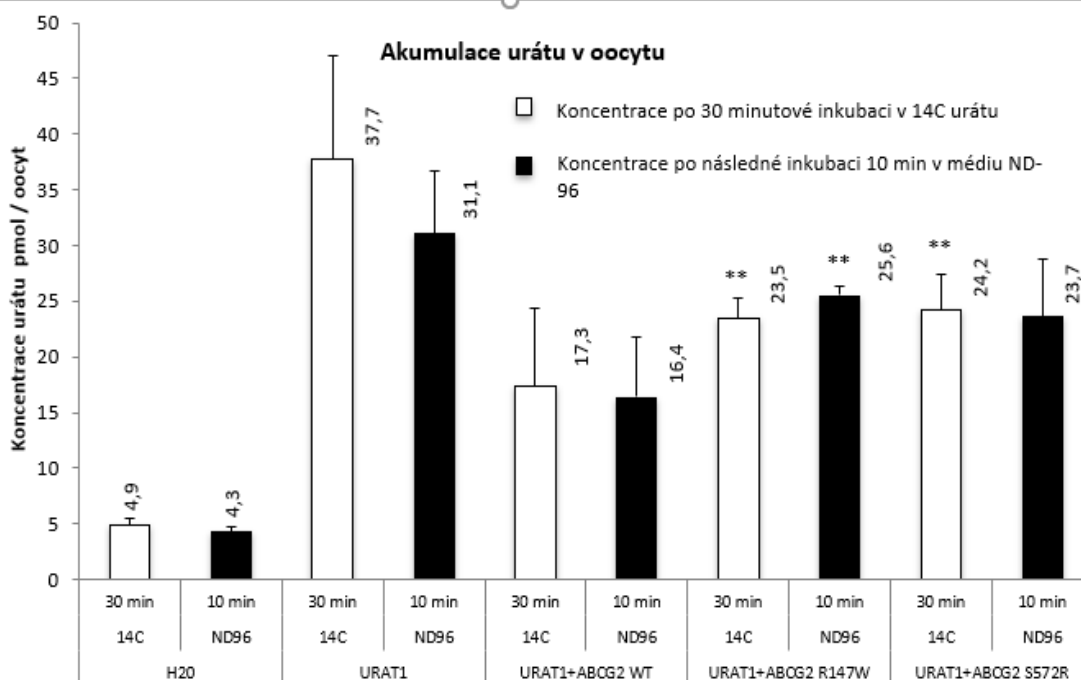
V následujících grafech (obrázky 8 až 11) uvádím přehled transportní funkce dané varianty transportéru ABCG2 exprimované v oocytech *X. laevis*. Testoval jsem oocyty injikované pouze vodou, injikované cRNA transportéru URAT1, cRNA wild type varianty transportéru ABCG2, cRNA transportérů URAT1 a wild type ABCG2 a dále pak cRNA transportérů URAT1 spolu s danou alelickou variantou ABCG2. Transport je vyjádřen jako látkové množství radioaktivní kyseliny močové akumulované v cytoplazmě oocyty v pmol.



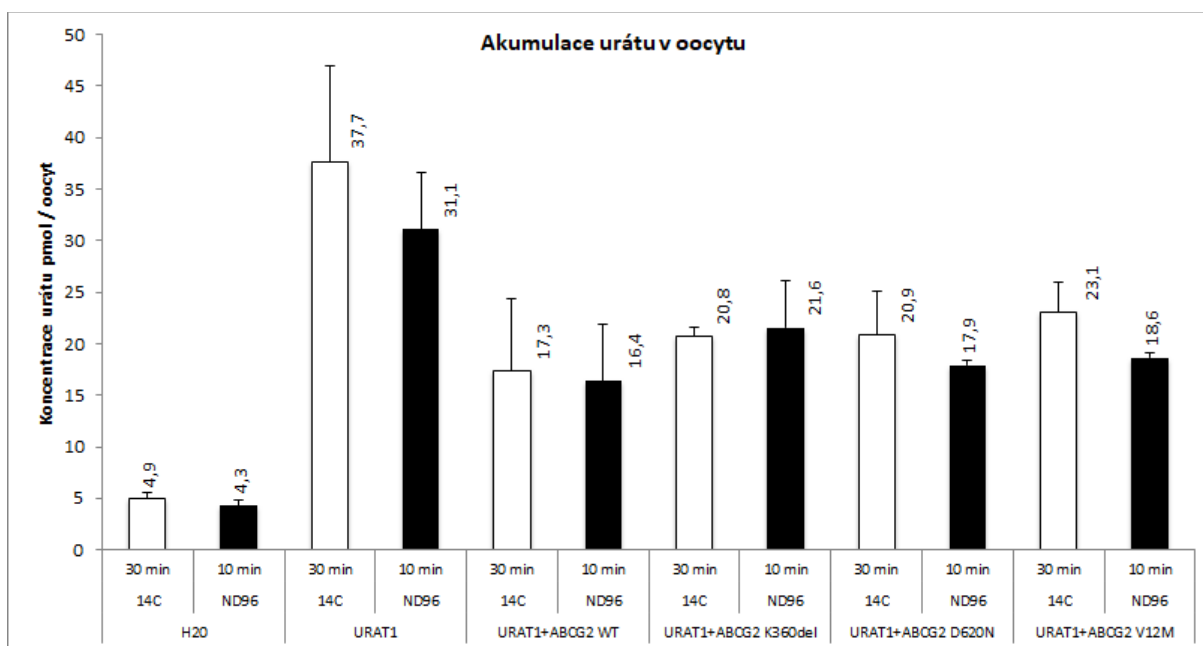
Obrázek 8. Uptake radioizotopu kyseliny močové ^{14}C do oocytů injikovaných vodou (H_2O), cRNA transportéru URAT1, cRNA divoké varianty transportéru ABCG2 (WT), cRNA transportéru URAT1 a transportéru ABCG2 WT a jeho alelické varianty Q141K. Svislá osa udává akumulovaný urát v cytoplazmě jednoho oocyty v pmol. Statistická analýza proběhla standardním Studentovým t-testem (* znamená $P < 5 \%$, ** znamená $P < 1 \%$).



Obrázek 9. Uptake radioizotopu kyseliny močové ¹⁴C do oocytů injikovaných vodou (H₂O), cRNA transportéru URAT1, cRNA transportéru URAT1 a transportéru ABCG2 WT a jeho alelické varianty T153M, varianty F373C, varianty T434M, varianty S476P. Svislá osa udává akumulovaný urát v cytoplasmě jednoho oocyty v pmol. Statistická analýza proběhla standardním Studentovým t-testem (* znamená P < 5 %, ** znamená P < 1 %).



Obrázek 10. Uptake radioizotopu kyseliny močové ¹⁴C do oocytů injikovaných vodou (H₂O), cRNA transportéru URAT1, cRNA transportéru URAT1 a transportéru ABCG2 WT a jeho alelické varianty R147W, varianty F373C, varianty S572R. Svislá osa udává akumulovaný urát v cytoplasmě jednoho oocyty v pmol. Statistická analýza proběhla standardním Studentovým t-testem (* znamená P < 5 %, ** znamená P < 1 %).



Obrázek 11. Uptake radioizotopu kyseliny močové ¹⁴C do oocytů injikovaných vodou (H₂O), cRNA transportéru URAT1, cRNA transportéru URAT1 a transportéru ABCG2 WT a jeho alelické varianty del K360, varianty D620N, varianty V12M. Svislá osa udává akumulovaný urát v cytoplasmě jednoho oocyty v pmol. Statistická analýza proběhla standardním Studentovým t-testem (* znamená P < 5 %, ** znamená P < 1 %).

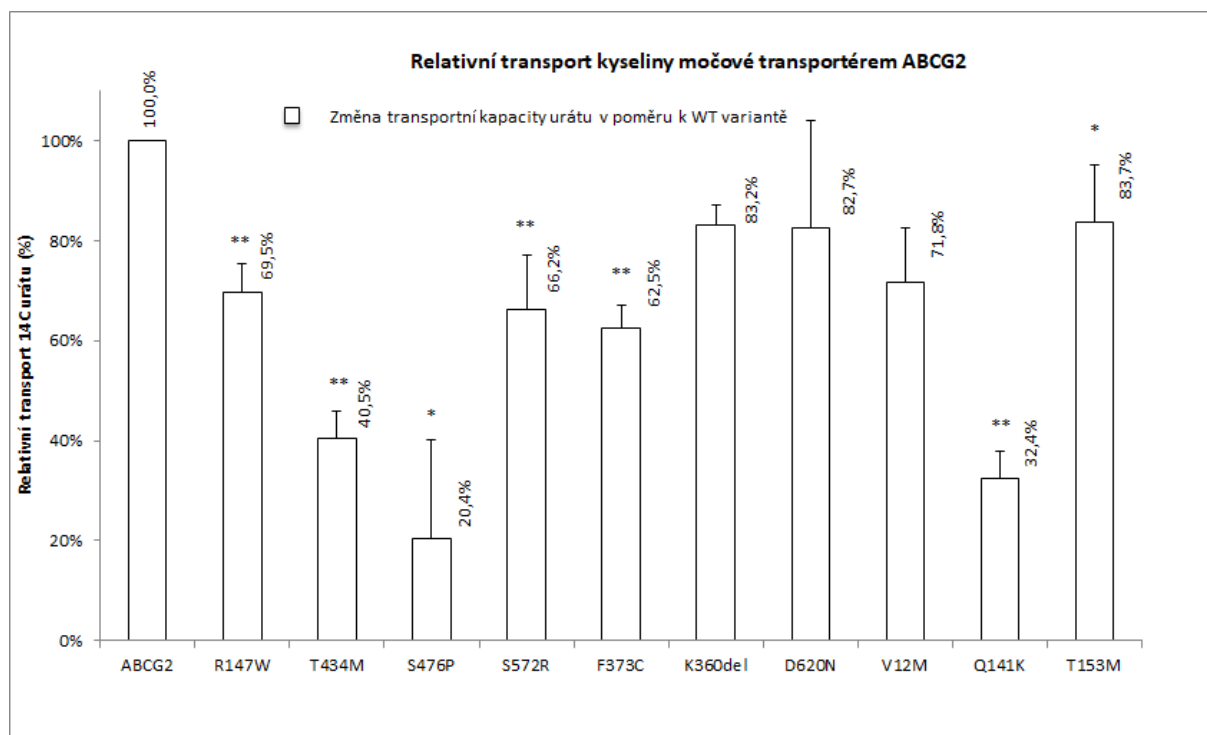
Z grafů (obr. 8 až 11) je patrné, že pasivní difuze kyseliny močové do oocyty během 30 minut dosahuje 4,9 pmol. Po následné desetiminutové inkubaci v ND-96 se množství urátu v oocyty sníží jenom minimálně. Inkubace oocytů s endogenně exprimovaným transportérem URAT1 (obr. 8 až 11) zvyšuje množství urátu v cytoplasmě na 37,7 pmol, což je 7,7 - krát větší uptake urátu než pasivní cestou za srovnatelných podmínek. Následná inkubace v ND-96 bez urátu snižuje množství v cytoplasmě na 31,1 pmol, což je 82,4 %. Oocyty s exprimovaným samotným proteinem ABCG2 (obr. 8) vykazují akumulaci urátu v množství 4,4 pmol, přičemž nedochází ke snížení během následné desetiminutové inkubace v ND-96. Akumulace v oocyty je tedy stejná jako u zcela neinjikované varianty. V případě, že byly oocyty injikovány mRNA pro URAT1 a divokou variantu ABCG2, došlo ke snížení množství akumulované kyseliny močové na 17,3 pmol, což je 45,9 % oproti oocytům exprimujícím pouze URAT1 zajišťující uptake (Obr. 8 až 11). Po dalších deseti minutách inkubace klesl obsah urátu v cytoplasmě na 16,4 pmol, což znamená pokles o 5,2 %.

Jednotlivé varianty ABCG2 vykazují zvýšení cytoplazmatické koncentrace urátu v oocyty, což ukazuje na jejich sníženou transportní kapacitu. Všechny varianty byly injikovány i transportérem URAT1 ve stejném množství (50 ng/ oocyt). Inkubace všech variant proběhla stejnou dobu za stejné teploty. ABCG2 Q141K vykazuje akumulaci urátu v množství 31,1 pmol, což představuje snížení transportní kapacity na 55,6 % kapacity wild type varianty (obr. 8). Po deseti minutách inkubace klesl obsah urátu na 25,8 pmol, což představuje další pokles o 17 %. Alelická varianta T153M (obr. 9) způsobuje akumulaci urátu 20,7 pmol, což představuje snížení transportní kapacity o 16,4 %. Po deseti minutách inkubace v médiu bez urátu došlo k poklesu na 20,3 pmol, což je snížení o 1,9 %.

Varianta F373C způsobuje akumulaci urátu v množství 25,0 pmol, což představuje pokles transportní kapacity o 30,8 % (Obr.9). Následná inkubace vedla ke snížení na 19,1 pmol, což je snížení o 23,6 %. Záměna T434M (obr. 9) zvyšuje cytoplazmatickou koncentraci urátu na 29,5 pmol znamenající snížení transportní funkce o 41,3 % s následným poklesem na 21,8 pmol (snížení o 26,1 %). Varianta S476P (obr. 9) vede ke zvýšení cytoplazmatické koncentrace kyseliny močové na 33,5 pmol (snížení transportu o 48,3 %), přičemž po deseti minutách další inkubace klesá množství urátu na 27,7 pmol (snížení o 17,3 %). Alelická varianta R147W způsobuje zvýšení množství kyseliny močové v oocytech na 23,5 pmol, tedy snížení transportu o 26,4 % (obr.10). Po deseti minutové inkubaci v ND-96 došlo naopak ke zvýšení množství urátu na 25,6 pmol (tedy o 8,9 %). Záměna S572R (obr. 10) ve struktuře ABCG2 způsobuje zvýšení urátu na 24,2 pmol (což je snížení transportní kapacity o 28,5 %). Následná inkubace způsobuje minimální pokles na 23,7 pmol (snížení o 2,0 %).

Ostatní varianty vykazují nesignifikanční zvýšení cytoplazmatické koncentrace urátu (obr. 11). Alelická varianta D620N zvyšuje množství urátu v cytoplazmě na 20,9 pmol, což znamená snížení transportní kapacity o 17,2 % . Po desetiminutové inkubaci v médiu ND-96 klesla koncentrace urátu v cytoplazmě na 17,9 pmol (snížení o 14,3 %). Varianta ABCG2 V12M zapříčinila zvýšení množství kyseliny močové v cytoplazmě na 23,1 pmol (pokles transportu o 25 %). Následná inkubace snížila množství urátu v cytoplazmě na 18,6 pmol (pokles o 19,4 %). Delece lysinu K360 způsobuje zvýšení intracelulárního urátu na 20,8 pmol, což představuje pokles transportu o 16,8 %. Následná inkubace paradoxně zvyšuje akumulaci urátu na 21,6 pmol (zvýšení o 3,7 %). Snížení transportní kapacity pro všechny varianty po 30 minutové inkubaci v radioaktivním urátu přehledně uvádí graf na obrázku 12. Tuto kapacitu jsem vyjádřil

jako poměr urátu transportovaného wt ABCG2 a urátu transportovaného danou alelickou variantou. Kyselinu močovou transportovanou tímto proteinem jsem uvažoval jako rozdíl látkového množství urátu v oocyty bez ABCG2 (pouze s transportérem URAT1 a množství urátu s proteinem ABCG2 (a transportérem URAT1). Snížení transportu jsem vyhodnotil pouze pro oocyty ihned po inkubaci homogenizované (nikoliv pro kultivované dalších deset minut).

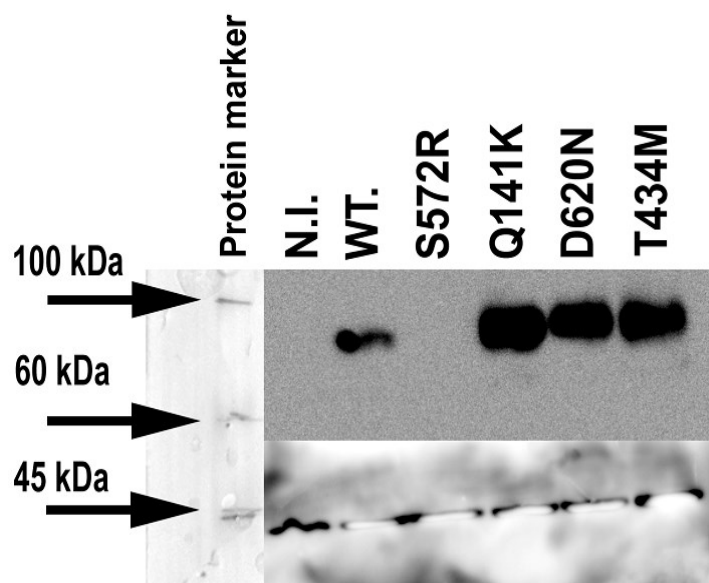


Obrázek 12. Snížení transportní kapacity pro kyselinu močovou alelických variant transportéru ABCG2. Pokles účinnosti je uveden v procentech vzhledem k transportní kapacitě divoké varianty (ABCG2 WT).

5.4. Analýza exprese ABCG2 alelických variant pomocí Western blotu

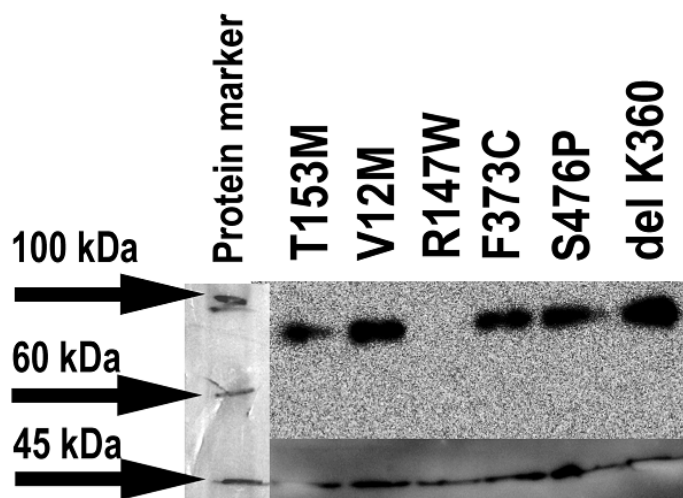
Z lyzátů celých oocytů, který jsem zbavil žloutkových a pigmentových granul jsem provedl SDS-PAGE a následnou imunodetekci na PVDF membráně (Western blot). Nejprve jsem provedl detekci proteinu ABCG2 protilátkou D5V2K (králíčí). Níže uvádíme chemiluminogram membrán s nanesenými vzorky lyzátů oocytů pro jednotlivé varianty s detekcí ABCG2. Chemiluminogram na obrázku 13 zachycuje první testovanou skupinu variant ABCG2. Všechny bandy mají molekulovou hmotnost cca 90 kDa, odpovídající glykosilovanému proteinu. U variant Q141K a T434M je velmi slabě detekován i proužek o molekulové hmotnosti 75 kDa, představující protein bez glykosylace. Neinjikovaný oocyt a alelická varianta S572R nejsou detekovány. U všech vzorků byl detekován protein β -aktinin o stejné intenzitě (bílé proužky jsou způsobeny

nadměrně koncentrovaným chemiluminiscenčním substrátem). Použil jsem proteinový standard Marker Color burst 8 kDa - 220 kDa.



Obr. 13. Chemiluminogram vzorků z oocytů neinjikovaných (N.I.), injikovaných divokou variantou ABCG2 (WT.) a alelickými variantami S572R, Q141K, D620N, T434M. Signál o molekulové hmotnosti cca 90 kDa představuje glykosilovaný ABCG2, signál o molekulové hmotnosti cca 45 kDa představuje protein β -aktinin (nanášecí kontrola). Proteinový marker Color burst 8 kDa - 220 kDa, nasnímán při bílém světle.

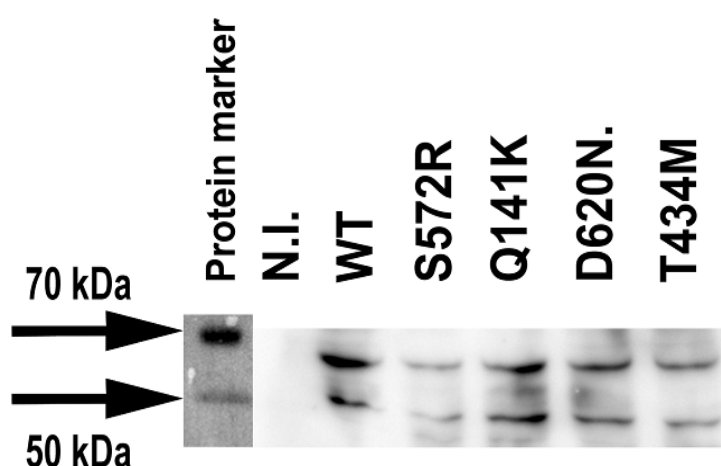
Chemiluminogram na obrázku 14 zachycuje detekované varianty ABCG2: T153M, V12M, R147W, F373C, S476P, delK360. Proužky představující ABCG2 mají molekulovou hmotnost cca 90 kDa. Neglykosilovaná forma ABCG2 nebyla detekována. Varianta R147W nebyla rovněž detekována. U všech vzorků jsem našel signál kontrolního proteinu β -aktinin o molekulové hmotnosti 45 kDa.



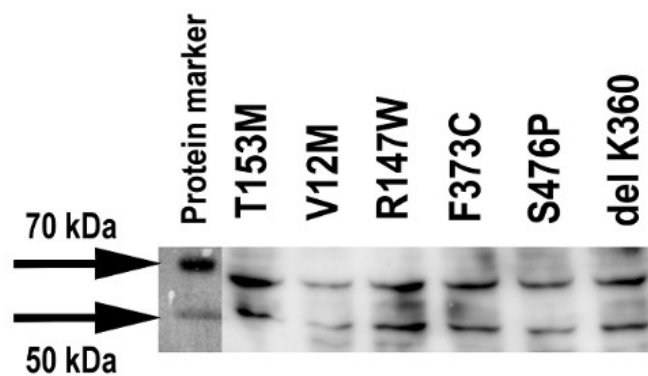
Obr. 14. Chemiluminogram variant ABCG2 T153, V12M, R147W, F373C, S476P, del K360. Signál o molekulové hmotnosti cca 90 kDa představuje glykosylovaný ABCG2, signál o

molekulové hmotnosti cca 45 kDa představuje protein β -aktinin (nanášecí kontrola). Proteinový marker Color burst 8 kDa - 220 kDa, nasnímán při bílém světle.

Jako poslední jsem provedl na další membráně se stejnými lyzáty detekci pomocného transportéru URAT1, zajišťující aktivní uptake kyseliny močové. Imunochemické značení bylo provedeno polyklonální protilátkou HPA024575. Obrázek 15 zachycuje značený URAT1 u první skupiny vzorků, jímž byly neinjikované oocyty (N.I.), oocyty exprimující současně i divokou variantu ABCG2 (WT) a alelické varianty S572R, Q141K, D620N, T434M. Proužky představují protein o molekulových hmotnostech 65 kDa a 50 kDa. U všech variant mimo neinjikovaných oocytů je zastoupen URAT1 ve stejném množství. Obrázek 16 zachycuje protilátkou značený URAT1 v druhé skupině vzorků, konkrétně u současně exprimovaných variant ABCG2 T153M, V12M, R147W, F373C, S476P, delK360. Detekovaný protein má molekulovou hmotnost 50 kDa a 65 kDa. Urat 1 je zastoupen ve všech vzorcích stejně.



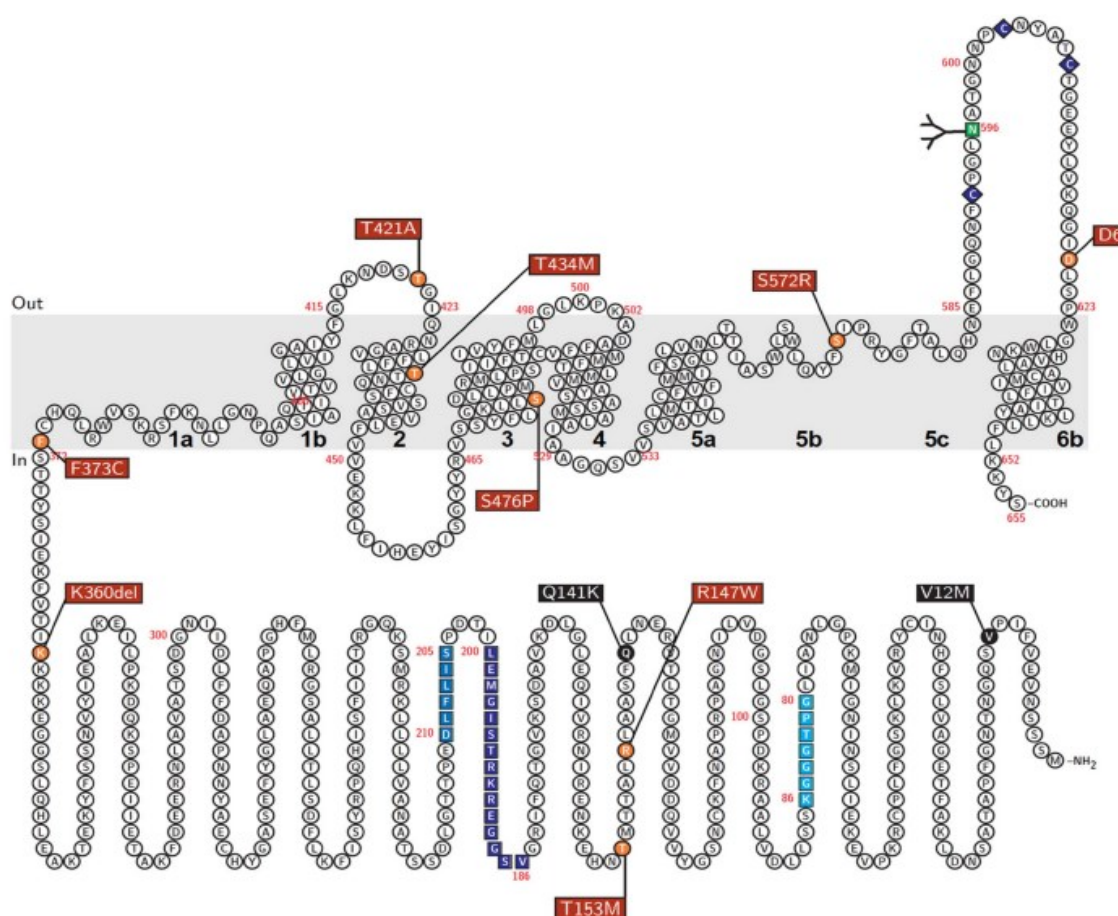
Obr. 15. Chemiluminogram vzorků z oocytů neinjikovaných (N.I.), injikovaných mRNA divoké varianty ABCG2 a URAT1 (WT) a dále pomocným transportérem URAT1 a variantami ABCG2 S572R, Q141K, D620N, T434M. Signál o molekulové hmotnosti cca 65 kDa představuje glykosylovaný URAT1, signál o molekulové hmotnosti cca 50 kDa představuje neglykosylovaný protein. Detekce polyklonální protilátkou. Proteinový marker Spectra multicolor broad range protein.



Obr. 16. Chemiluminogram vzorků z oocytů injikovaných mRNA pomocného transportéru URAT1 a mRNA alelických variant ABCG2 S572R,Q141K,D620N,T434M. Signál o molekulové hmotnosti cca 65 kDa představuje glykosylovaný URAT1, signál o molekulové hmotnosti cca 50 kDa představuje neglykosylovaný protein. Detekce polyklonální protilátkou. Proteinový marker Spectra multicolor broad range protein.

6. Diskuze

Provedl jsem *in vitro* transportní studie alelických variant transportního proteinu ABCG2. Za tímto účelem jsem využil oocyty žáby *Xenopus laevis* z chovu Laboratoře vývojové biologie PŘF UK. Po mikroinjekci cRNA a expresi divoké či příslušné alelické varianty ABCG2 jsem měřil uptake radioaktivně značené kyseliny močové. Alelické varianty, představované aminokyselinovými záměnami v polypeptidové struktuře, uvádím ve schematicky znázorněné struktuře transportéru ABCG2 na obrázku 17.



Obr. 17 Struktura jedné podjednotky transportéru ABCG2 s vyznačením mnou analyzovaných aminokyselinových záměn. Schéma zobrazuje nukleotid vazebnou doménu (dolní část), transmembránovou doménu tvořenou šesti α -helixy (horní část) a linker region spojující obě domény. Převzato z (Toyoda et al. 2019).

6.1. Uptake urátu oocyty *Xenopus laevis*

V této kapitole diskutuji dosažené výsledky s vyslovenou hypotézou a s literaturou. Neinjikované oocyty vykazují velmi malý pasivní uptake kyseliny močové. Tento fakt je v rozporu s literaturou, kde jsou oocyty inkubovány v kyselině močové za využití

pasivní difuze (Woodward et al. 2009). Možné vysvětlení spatřuji v tom, že při pH = 7,6, které panuje v inkubačním médiu, se kyselina močová vyskytuje převážně jako záporně nabitý aniont urát a jako nabitá látka tedy poměrně obtížně prostupuje cytoplasmatickou membránou oocyty. V některých funkčních studiích autoři inkubovali oocyty přes noc při 15°C a nebo 1 až 2 hodiny při pokojové teplotě, popřípadě přímo urát injikoval do oocytů (Woodward et al. 2009; Chiba et al. 2015). Doba naší inkubace byla 30 minut při pokojové teplotě, tudíž nedostačovala pro dostatečnou pasivní difuzi urátu do oocyty. Navíc urát značený prostřednictvím izotopu uhlíku C14 je slabým zářičem a z toho důvodu i při desetiminutové době měření ve scintilační počítací jsou hodnoty rozpadů za minutu příliš malé a jsou tak zatíženy relativně velkou chybou. Ve svém důsledku se nedá dost dobře rozpoznat, jestli případné snížení aktivity v cytoplasmě je důsledkem činnosti exportéru ABCG2 nebo chybou měření aktivity. Jistým řešením by mohlo být zvýšení koncentrace aktivního vůči studenému urátu, ale to zase naráží na finanční limity. Woodward et al. (2009) prováděl své studie s 50 μM aktivním urátem (a s 500 μM urátem přes noc) a v této směsi inkuboval vždy 10 oocytů po pěti skupinách. Chiba et al. používali koncentraci 50 μM ^{14}C urátu a inkubaci během 60 minut (ovšem pro transportér NPT1) (Chiba et al. 2015).

Transportér URAT1 zajišťuje uptake kyseliny močové do oocyty, jejíž hladina je výrazně vyšší oproti neinjikovaným oocytům. Exprese tohoto transportéru byla zvolena s ohledem na nedostatečně vysokou aktivitu kyseliny močové v oocyty po třiceti minutové inkubaci v médiu. Uptake urátu do cytoplasmy oocyty prostřednictvím URAT1 tak zajišťuje výchozí koncentraci, která může být snížena exprimovaným transportérem ABCG2. Enomoto et al. uvádí uptake urátu prostřednictvím transportéru URAT1 v inkubačním médiu ND-96 0,19 pmol/min.oocyt, recentní práce Lee uvádí hodnotu transportu 0,12 pmol/min.oocyt v médiu ND-96, další práce se shodují s těmito hodnotami (Enomoto et al. 2002; Mandal et al. 2017; Lee et al. 2019). Moje hodnota činí 37,5 pmol/oocyt během 30-ti minutové inkubace, což odpovídá hodnotě 1,25 pmol/min.oocyt. Rozpor v těchto hodnotách si vysvětluji tím, že v mém případě probíhala inkubace v médiu ND-96 s koncentrací urátu 600 μM , v případě Enomota v koncentraci 50 μM a dále v tom, že v našem případě inkubace probíhala při pokojové teplotě (tj. 25 °C), což mohlo mít za následek vyšší rychlost enzymatické reakce i když Lee et al. inkuboval oocyty dokonce při teplotě 37°C. Případně mohla sehrát roli vyšší exprese URAT1 v oocytech v našem případě, i když je nutno podotknout, že jak Enomoto, tak Lee injikovali 50 ng mRNA na oocyt, stejně jako já. Další možností je

zvýšený uptake způsobený narušenou cytoplazmatickou membránou v místě vpichu kapiláry při mikroinjikaci. Koncentrace kyseliny močové v oocytu klesla po deseti minutách inkubace v médiu ND-96 bez kyseliny močové, což může být způsobeno jednak činností endogenních exportérů v membráně oocytu a nebo výše zmíněnou možnou trhlinou v cytoplazmatické membráně oocytů. Vzhledem k relativně velkému rozptylu hodnot je ale možné, že se ve skutečnosti spíše jedná o statistickou odchylku. Wt varianta ABCG2, exprimovaná bez přítomnosti pomocného transportéru URAT1, snižuje koncentraci urátu v oocytu o 10 %. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot ale nelze tvrdit, že toto snížení má na svědomí právě aktivní transport urátu prostřednictvím ABCG2 a hodnota tak není průkazná. Woodward et al. uvádějí snížení akumulace urátu v oocytu o asi 68 % a to při inkubaci v médiu s 500 μ M koncentrací urátu a po 120 minutové době (Woodward et al. 2009). Při těchto podmínkách mnou inkubované oocyty již nekrotizovali. Proto jsem se rozhodl použít pro zajištění uptake kyseliny močové pomocný transportér URAT1.

Následná inkubace deset minut v roztoku ND-96 již víc nezměnila obsah kyseliny močové v oocytu. Hodnota koncentrace urátu u oocytů exprimujících ABCG2 je také téměř shodná s koncentrací u oocytů neinjikovaných, tedy bez exprimovaných transportních proteinů. To naznačuje, že veškerý urát akumulovaný do oocytů transporterem URAT1 je exportován ven proteinem ABCG2. Proto po dalších deseti minutách inkubace v médiu bez urátu již nemůže dojít k dalšímu snížení jeho cytoplazmatické koncentrace.

Oocyty exprimující wild type variantu transportéru ABCG2 spolu s transportérem URAT1 vykazují během 30-ti minutové inkubace látkové množství kyseliny močové 17,3 pmol/oocyt, což odpovídá transportní kapacitě ABCG2 $(37,5 - 17,3)/30 \text{ min} = 0,67 \text{ pmol/oocyt.min}$. Woodward ve své práci uvádí akumulaci urátu v oocytu exprimujícím ABCG2 asi 0,40 pmol/oocyt během stovacetiminutové inkubace oproti oocytům bez exprese tohoto transportéru, kde byla zjištěna akumulace 1,5 pmol/oocyt. To odpovídá transportní kapacitě $(1,5 - 0,4)/120 = 0,0091 \text{ pmol/oocyt.min}$ (Woodward et al. 2009). Jinými slovy mnou zjištěná hodnota transportu kyseliny močové wild type variantou je 74 x vyšší než publikovaná hodnota. Tento rozpor si vysvětluji především tím, že autoři zde inkubovali oocyty v 500 μ M kyselině močové při 15 °C, kdežto v mém případě probíhala v téměř stejné koncentraci inkubace při pokojové teplotě. Teplota tedy mohla pozitivně ovlivnit aktivitu enzymu, což je v souladu s tím, že se jedná o lidský transportér, pracující v teplotním optimu 37°C. Dalším faktorem může být právě

zmíněný aktivní transport kyseliny močové do oocyty prostřednictvím URAT1, který způsobuje vyšší koncentraci kyseliny močové v cytoplazmě (100 - krát). Je tedy možné, že relativně nižší koncentrace kyseliny močové v oocyty v práci Woodwarda et al. (2009) způsobená difuzí, a která poskytuje méně intracelulárního substrátu pro ABCG2 než u oocytů s exprimovaným URAT1, obsazuje méně často menší počet transportérů, což vede k nižší průměrné transportní rychlosti. Ichida publikoval hodnotu Michaelis - Menteovské konstanty $K_m = 8,24 \text{ mM} \pm 1,44$ a $V_{max} = 6960 \text{ pmol/min}$ vztaženou na mg proteinu (Ichida et al. 2009). Jelikož jsem však nestanovil množství exprimovaného ABCG2 na membráně oocyty, není možné z této hodnoty vyvodit přímý závěr. Je ale zřejmé, že hodnota koncentrace urátu v oocyty v mém případě je bližší hodnotě rovnovážné konstanty než hodnota Woodwardova, což nutně vede k vyšší transportní rychlosti. Inkubace deset minut v médiu ND-96 bez kyseliny močové vede k dalšímu poklesu intracelulárního urátu, což znamená, že transportér je i nadále plně funkční, avšak transport se poněkud zpomalil, což může být výsledkem výpadku uptake urátu, snížením intracelulární koncentrace o 55 % a následkem toho dochází i ke snížení transportní rychlosti. Imunodetekce na membráně potvrdila přítomnost wt varianty ABCG2. Nehomogenitu v intenzitě signálu pro tuto variantu spíš přičítám na vrub nedokonale provedenému Western blotu.

6.2. Funkční studie alelických variant transportéru ABCG2

Varianta Q141K transportéru ABCG2 vykazuje signifikantně nižší transportní kapacitu, což je se projevuje zvýšenou koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové v oocyty oproti wild type variantě. Ichida et al. (2009) popsal v experimentu na membránových váčcích z buněk linie HEK293 snížení ATP závislého transportu na 47 % transportní kapacity wild type varianty proteinu. Higashino popsal snížení na 44% transportní aktivity (Higashino et al. 2017). Woodward v experimentu s oocyty exprimujícími endogenní ABCG2 s mutací Q141K došel k obdobnému závěru - redukce akumulace byla 54 % oproti wt variantě. V našem případě došlo ke snížení transportní kapacity pro urát na 32% kapacity wt proteinu. Tato hodnota, vyjádřená jako poměr množství urátu přenesené divokou variantou ABCG2 oproti množství přenesenému variantou Q141K, je nižší než uvádějí literární údaje. Odchylna je zřejmě způsobena jinými podmínkami kultivace, než použili ostatní autoři či menším množstvím oocytů ve funkční studii.

V literatuře byla popsána jako možná příčina snížení transportu snížená exprese varianty Q141K transportéru ABCG2 (Imai et al. 2002; Toyoda et al. 2019). Tento jev lze vysvětlit zvýšenou ubiquitinací a následnou degradací této varianty v proteasomu, přičemž experimenty podporující tuto hypotézu byly provedeny na buněčné linii Flp-In-293 (Furukawa et al. 2009). Také se uvažuje o negativním vlivu na stabilitu nukleotid vazebné domény ABCG2 (Woodward et al. 2013). Tato stabilita může být ovlivněna interakcí mezi nukleotid vazebnou a částí transmembránové domény (László et al. 2016). Imunodetekcí Western blotem, kterou jsem pro každou variantu provedl z pěti oocytů jsem však nezjistil výrazně odlišnou míru exprese této varianty. Tento fakt si vysvětluji tím, že jsem k provedení Western blotu použil lyzáty celých oocytů (pouze se separovanými žloutkovými granulemi), tudíž jsem detekoval i protein, který nebyl exocytován na membránu a nebyl tedy ve skutečnosti funkční. Ověření míry exprese ABCG2 na membráně jsem chtěl provést pomocí povrchové biotinylace nebo separací membrán, která se bohužel nezdařila a výsledky tak nebyly průkazné. Na druhou stranu Woodward uvádí u oocytů *X.laevis* mikroinjikovaných stejným způsobem alelickou variantou Q141K ABCG2 shodnou míru exprese ABCG2 na membráně u této varianty i wild typu (Woodward et al. 2009). Po inkubaci v čistém médiu bez radioaktivního urátu došlo ke snížení aktivity v cytoplasmě oocyty. Tento úbytek má vysvětlení opět v odstranění zdroje urátu z kultivačního média a tím pokles aktivního uptake a následně i efluxu. Alelická varianta transportéru ABCG2 Q141K je spojena se vznikem hyperurikemie a dny. Tento závěr byl potvrzen studiemi provedenými na japonské, americké i afroamerické populaci, části Polynézké populace i v populaci české (Woodward et al. 2009; Yamagishi et al. 2010; Phipps-Green et al. 2010; Stiburkova et al. 2017). V mnou provedené funkční studii jsem v souladu s ostatními autory zaznamenal pokles transportní funkce ABCG2 Q141K, který lze dát do souvislosti s výskytem hyperurikemie a dny u nositelů této mutace. Vyšší hladina urátu v séru je zřejmě způsobena sníženou účinností exkrece urátu tímto transportérem.

Varianta R147W je první z testovaných variant, která byla popsána u pacientů trpících dnou a pocházejících z České republiky. Je však zastoupena zřejmě velmi vzácně (Stiburkova et al. 2017). Při in vitro transportní studii se manifestuje signifikantně nižší transportní kapacitou projevující se zvýšenou koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové v oocyty oproti wild type variantě. Vzhledem k blízkosti argininu 147 (R147) ke glutaminu 147 (Q141) můžeme očekávat, že i tato záměna bude ovlivňovat

stabilitu nukleotid vázající domény a snižovat tak transportní schopnost proteinu, podobně jako výše zmíněná varianta Q141K. V recentní práci Zámbo et al. (2019) v experimentu na membránových váčkách z buněk sf9 ukázali, že varianta R147W skutečně nevykazuje žádnou ATPázovou aktivitu. Z toho je možné učinit závěr, že protein s touto mutací není schopen vůbec žádný substrát přenášet. Naproti tomu Kondo et al. popsali u téměř sousední aminokyselinové záměny alaninu za prolin (A149P) jen velmi málo narušený transport substrátu, jímž byl metotrexát a dehydroepiandrosteron sulfát (Kondo et al. 2004). Na Western blotu z celých oocytů z naší studie nebyl protein vůbec detekován. To je v souladu s prací spolupracujícího japonského týmu, který na povrch membránových váčku z buněk HEK293 exprese proteinu také vůbec nenalezl (Toyoda et al. 2019). Stejný fenomén, tedy absence transportéru s touto mutací na cytoplazmatické membráně, byl zaznamenán i v další práci (Zámbo et al. 2019). Náš výsledek tedy spíše ukazuje na únik urát z oocytu pasivní cestou a to buď prostou difuzí nebo porušenou cytoplazmatickou membránou. Schopnost transportéru s touto variantou přenášet urát je tedy zřejmě pouze artefakt vzniklý při našich funkčních studiích. Po desetiminutové inkubaci v médiu bez aktivního urátu došlo ke zvýšení aktivity v cytoplazmě oocytu, což si vzhledem k velikosti směrodatné odchylky vysvětlujeme spíše tak, že ve skutečnosti je koncentrace radioaktivního urátu stejná i po desetiminutové inkubaci v médiu, což dokresluje nefunkčnost této varianty transportéru. Příčinou nefunkčnosti ale bude spíše chybná maturace a předčasná degradace takto postiženého proteinu, než defekt ve vazbě substrátu nebo ATP: Tato alelická varianta se skutečně vyskytuje u pacientů s patologicky vysokou hladinou kyseliny močové, která je příčinou hyperurikemie či dny (Stiburkova et al. 2017).

Další alelická varianta transportéru ABCG2 (S572R) byla dosud popsána pouze u české kohorty pacientů s dnou (Stiburkova et al. 2017). Varianta S572R se také projevuje signifikantně sníženou transportní kapacitou (o 33,8 % vyjádřeno nárůstem akumulace urátu), která se projevuje vyšší koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové v oocytu ve srovnání s wt variantou ABCG2. Toyoda et al. (2019) naopak nedetekovali žádnou transportní aktivitu pro kyselinu močovou. Serin 572 se nachází v páté transmembránové smyčce ABCG2 a je také součástí možného CRAC motivu pro vazbu cholesterolu, který je konzervován mezi všemi obratlovci, avšak jak se ukázalo, není místem regulace cholesterolem (Gál et al. 2015). Lászlo et al. na

počítačovém modelu taktéž ukázal, že oblast páte membránové smyčky tvoří smyčku tvaru V obrácenou do lipidové dvojvrstvy a je analogická P-smyčkám iontových kanálů (László et al. 2016). Je tedy možné, že se tato smyčka se podílí na exportu substrátu na extracelulární straně membrány a že právě serin 572 se může podílet na transportu urátu. Nicméně mutace sousedního tyrozinu 570 (Y570S) neměla vliv ani na ATPázovou aktivitu ani na expresi proteinu (Gál et al. 2015). Drobné snížení koncentrace kyseliny močové v oocyty po desetiminutové inkubaci v médiu ND-96 lze vysvětlit nepřesností měření a rozptylem hodnot. Z lyzátu z celého oocyty jsem nezjistil žádnou expresi proteinu ABCG2. Toyoda et al. (2019) v buňkách HEK 293 prokázali dále nepřítomnost transportéru na plazmatické membráně. Podobně mutace v sousední aminokyselině, izoleucinu 573 (záměna I573A) vede ke ztrátě zacílení proteinu na membránu buněk a zůstává tak na membráně endoplazmatického retikula (Haider et al. 2015). Takto je možné vysvětlit nízkou až žádnou funkci této varianty její nepřítomností na membráně oocyty. Alelická varianta S572R transportéru ABCG2 v mnou provedené funkční studii snižuje transport kyseliny močové, což odpovídá jejímu výskytu u pacientů s hyperurikemií a dnou, které jsou zřejmě způsobené sníženým vylučováním urátu prostřednictvím tohoto transportéru (Toyoda et al. 2019).

Stejně jako předchozí dvě varianty byla i další popsána na kohortě českých pacientů trpících dnou. Alelická varianta T153M se v naší funkční studii projevuje signifikantně nižší účinností transportu urátu, tudíž oocyty vykazují zvýšenou koncentraci radioaktivně značené kyseliny močové. Transportní účinnost je snížena pouze asi o 16 %. Po inkubaci v médiu bez kyseliny močové po dobu deset minut již nedošlo k dalšímu výraznému snížení jeho intracelulární koncentrace. Je možné, že snížení spíše není patrné díky směrodatné odchylce. V experimentu na invertovaných membránových váčcích z buněk HEK293 byl zjištěn stejný trend, tedy snížení transportu urátu, konkrétně na 25 % transportní aktivity wt varianty (Toyoda et al. 2019). Další práce uvádí rovněž snížení transportní aktivity (pro substrát Hoechst 33342) a také snížení ATPázové aktivity proteinu s touto mutací o zhruba 50 % (Zámbó et al. 2019). Western blot z celobuněčných lyzátů oocyty ukázal, že je protein exprimován, ale zřejmě se sníženou mírou oproti wild typu. Zámbó et al. uvádí v experimentu na buněčné linii HEK293 nižší celkovou expresi této varianty, ale téměř stejné zastoupení proteinu na cytoplazmatické membráně. Nižší celkovou expresi u stejné buněčné linie zaznamenal i Toyoda et al. (2019), stejně jako Yoshioka et

al.(2007), který rovněž popsal nižší rezistenci transfekovaných buněk k cytostatiku SN-38 (Zámbó et al. 2019; Yoshioka et al. 2007; Toyoda et al. 2019). Záměna T153M se nachází mezi Walkerovým motivem A a B v nukleotid vazebné doméně. Vzhledem ke své relativní blízkosti k výše zmíněnému glutaminu 141 je možné, že záměna threoninu za nepolární methionin narušuje interakci mezi nukleotid vazebnou doménou a spojovacím helixem. Obdobný mechanismus se předpokládá u varianty Q141K (László et al. 2016). Snížená transportní účinnost této varianty ABCG2 koreluje s výskytem dny a hyperurikemie u jejích nositelů (Stiburkova et al. 2017). Vzhledem k tomu, že se moje výsledky odchylují od literárních údajů, nelze jednoznačně říci, že se skutečně tato varianta podílí na vzniku dny.

Další varianta byla také popsána u pacientů s dnou (Stiburkova et al. 2017). V rámci funkční studie jsem zjistil, že záměna fenylalaninu 373 za cystein (F373C) způsobuje signifikantně sníženou transportní schopnost ABCG2 což se projevuje zvýšenou koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové v oocytu. Snížení transportní kapacity činí 62,5 % aktivity wild type varianty ABCG2 (snížení o 30,6 %). Toyoda stanovil u této varianty snížení transportní aktivity na 60 % aktivity wt formy (Toyoda et al. 2019). Také v další studii bylo zaznamenáno snížení transportu Hoechst 33342 a to na 82 %. Bazální aktivita byla zjištěna na stejné úrovni jako u divoké varianty transportéru, ale na rozdíl od něj není stimulovatelná quercetinem (Zámbó et al. 2019). Námi zjištěná aktivita transportéru tedy odpovídá zjištění ostatních autorů. Zároveň po desetiminutové inkubaci v médiu bez urátu došlo k dalšímu snížení jeho koncentrace uvnitř oocytu, což naznačuje, že je transportní aktivita zachována. Alelická varianta postihuje konec spojovacího linkeru mezi nukleotid vazebnou a transmembránovou doménou. Obdobně jako u další varianty, delece lyzinu 360 (viz níže), se nabízí otázka, jestli mutace F373C ovlivňuje oblast homologickou s kanonickým C-motivem. Tento motiv se nachází v pozici L352 až E356 a výskyt mutací v ní snižuje transport substrátu i ATPázovou aktivitu (Macalou et al. 2016). Vzhledem k zachovalé ATPázové aktivitě lze předpokládat, že transport je snížen spíše následkem sníženého množství transportéru na cytoplazmatické membráně. Zambó et al. (2019) uvádí asi 75 % exprese alelické varianty na membráně než u divoké varianty. Obdobný výsledek uvádí i Toyoda, kdy u celobuněčného lysátu rovněž došlo ke snížení exprese (Toyoda et al. 2019; Yoshioka et al. 2007). Po detekci Western blotem jsem ale zjistil přibližně stejnou míru exprese jako u wild type varianty. Je ale spíše možné, že se jedná o experimentální

artefakt způsobený nedokonale provedeným Western blotem. Snížení transportní kapacity touto mutací odpovídá pozorování, že její výskyt u pacientů je spojen s výskytem dny a hyperurikemie (Stiburkova et al. 2017).

Mezi další, vzácný haplotyp ABCG2, který se nachází u pacientů s dnou patří záměna threoninu 434 za methion (T434M). Podle námi provedené funkční studie má varianta T434M signifikantně sníženou transportní kapacitu. Snížení kapacity se jako u ostatních variant, projevuje zvýšenou koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové uvnitř oocyty. Transportní kapacita urátu v oocyty je snížena na 40,5 % transportu u wild type varianty ABCG2. V Zambóově práci je zřejmé také snížení transportní aktivity a to na 76 % oproti divoké variantě. Bazální ATPázová aktivita této varianty je naopak zvýšena asi o 50 % (Zámbó et al. 2019). V experimentu na invertovaných membránových váčcích se potvrdil snížený transport kyseliny močové, a to sice až na cca 5 % aktivity wild type varianty (Toyoda et al. 2019). Po homogenizaci celých oocytů jsem v lyzátu detekoval ABCG2 T434M zhruba ve stejném množství jako u divoké varianty. Toto pozorování odpovídá údajům v literatuře, přičemž obsah proteinu na cytoplazmatické membráně odpovídá divoké variantě proteinu (Toyoda et al. 2019; Zámbó et al. 2019). Záměna threoninu 434 za methionin se nachází ve druhé transmembránové smyčce. Vzhledem k tomu, že není narušena exprese ani zacílení proteinu na membránu, uvažujeme spíše o porušení schopnosti transmembránové domény vázat substrát. Snížená ATPázová aktivita by odpovídala spíše výsledkům zjištěným Toyodou (nízká transportní aktivita pro urát). Naopak mé výsledky se spíše shodují se zjištěním Zambó. Navíc snížení koncentrace kyseliny močové v oocyty po desetiminutové inkubaci spíše ukazuje, že tato varianta je skutečně transportně funkční a proto došlo v nepřítomnosti urátu v inkubačním médiu ke snížení jeho intracelulární koncentrace. Výsledky získané na membránových váčcích, to je vysoká ATPázová aktivita (Zámbó et al. 2019) a současně nízká transportní schopnost pro urát (Toyoda et al. 2019) naznačují, že u této varianty při přípravě nebo testování invertovaných váčků dochází ke změně aktivity transportéru. Pro takové tvrzení je však nutné provést další opakování těchto experimentů s touto variantou. V literatuře jsou popsány dvě mutace ve stejné membránové smyčce. Alelická varianta F431L způsobuje sníženou rezistenci k cytostatiku SN-38 a mitoxantronu, ač se nemění exprese proteinu (Yoshioka et al. 2007; Ai Tamura et al. 2007). Další alelická varianta ležící ve druhé transmembránové smyčce je S441N.

Tato varianta naopak způsobuje nižší expresi, přičemž protein je degradován v proteazomu (Nakagawa et al. 2008). I tato varianta způsobuje snížení transportu metotrexátu, porfyrinů či estron sulfátu k nule (A. Tamura et al. 2006; Sjöstedt et al. 2017). Dalo by se tedy předpokládat, že mutace v této transmembránové smyčce snižují účinnost transportu a to buď tak, že způsobují degradaci nascentního proteinu nebo tak, že záměnou aminokyselin dochází ke ztrátě specifity pro daný substrát. U námi testované varianty T434M se zdá, že tento threonin napomáhá vazbě urátu na transmembránovou doménu nutnou k jeho úspěšnému exportu ven z buňky. Pokles transportní funkce pro kyselinu močovou této varianty koreluje s výskytem hyperurikemie a dny u pacientů nesoucích tento haplotyp (Stiburkova et al. 2017).

Alelickou variantou, která až dosud nebyla popsána v databázi, je záměna serinu 476 za prolin (S476P) (Stiburkova et al. 2017). Mutace způsobená touto variantou má podle mnou provedené funkční studie na svědomí téměř úplné zastavení transportu urátu (transportní aktivita je 20,4 % aktivity wt varianty). Koncentrace kyseliny močové v oocyty je téměř stejně velká jako u oocytů bez exprimovaného ABCG2, do nějž je radioaktivně značený urát transportován prostřednictvím proteinu URAT1. Po desetiminutové inkubaci v médiu bez urátu se ale ukazuje, že se aktivita v oocyty snižuje, což znamená, že transportér i tak nějaký urát přenáší. Vzhledem k velikosti směrodatných odchylek je také možné, že ve skutečnosti byl transport po deseti minutách minimální a jedná se tedy pouze o odchylku, způsobenou nedostatečně přesným měřením aktivity. V experimentu na buněčné linii HeLa byl změřen pokles aktivity, představovaný poklesem akumulace barviva Hoechst 33342, na 73 % aktivity divoké varianty transportéru. Snížení ATPázové aktivity je na úrovni asi 30 % wild type varianty (Zámbó et al. 2019). V experimentu provedeném na membránových váčcích došlo ke snížení asi na 10 % transportní aktivity nemutovaného proteinu (Toyoda et al. 2019). Detekcí na Western blotu jsem zjistil stejné zastoupení proteinu v celkovém lyzátu jako u divoké varianty. Tento fakt je v souladu jak se zjištěním Zámbó, tak i Toyody (Toyoda et al. 2019; Zámbó et al. 2019). Záměna serinu za prolin se nachází ve třetí transmembránovém α -helixu ABCG2. Aminokyselinovou záměnou, která se vyskytuje ve stejné membránové smyčce, je záměna fenylalaninu 489 za leucin (F489L). Tato varianta rovněž snižuje transport estron sulfátu a fluorescenčního barviva lucifer yellow. Jelikož je rovněž snížena exprese této varianty dá se předpokládat, že právě to způsobuje sníženou transportní aktivitu (Sjöstedt et al. 2017;

Deppe et al. 2014). V případě námi testované varianty sice nebyla snížena exprese S476P varianty ABCG2, ale i tak se poškození sekvence třetí transmembránové smyčky podílí na ztrátě afinity její k substrátu. Jak jsem uvedl výše, transmembránová doména zřejmě tvoří část nutnou pro export substrátu do extracelulárního prostoru (László et al. 2016). Zřejmě je tedy serin 476 nutný pro vazbu kyseliny močové na transmembránovou část. Předpoklad, že alelická varianta způsobuje hyperurikemii a dnu u svých nositelů prostřednictvím poškození funkce transportéru ABCG2 byl experimentálně potvrzen.

Delece lysinu K360del v české skupině pacientů s dnou byla identifikována jako vzácná. V naší funkční studii se tato alelická varianta projevila nesignifikantně mírně sníženou transportní kapacitou, která způsobuje zvýšenou koncentraci radioaktivně značené kyseliny močové v oocytech. Ve srovnání s wild type variantou ABCG2 jde o snížení na úroveň 83 % činnosti divoké varianty. Detekcí pomocí Westernblotu jsem tuto variantu našel v celkovém lyzátu v přibližně v množství stejném jako variantu divokou. V experimentu na membránových váčcích byl zjištěn naopak zvýšený transport kyseliny močové. Expres zůstala nezměněna (Toyoda et al. 2019). Naopak v HeLa buňkách exprimovaná varianta způsobuje snížení asi na 71 % činnosti wild type varianty, přičemž ATPázová aktivita byla zvýšena asi o 20 %. Expres na membráně i v celkovém lyzátu byla srovnatelná s divokou variantou (Zámbo et al. 2019). Desetiminutová inkubace v médiu bez urátu se neprojevila snížením, což může být artefakt v rámci směrodatné odchylky. Delece lysinu 360 se nachází ve spojovací oblasti (linker regionu) mezi nukleotid vazebnou a transmembránovou doménou transportéru ABCG2. Vliv mutací v této části transportéru, jak již bylo uvedeno výše, analyzoval Macalou et al. (2016). Záměna ve struktuře polypeptidu v oblasti tzv. C-motivu, který představuje aminokyseliny 352 až 356, vede ke snížení transportní funkce, která byla v původní práci představována rezistencí k cytostatiku mitoxantron. Také ATPázová aktivita byla snížena (mutacemi v leucinech 352 a 353). Zároveň nebyla těmito mutacemi výrazně pozměněna exprese na cytoplazmatické membráně (Macalou et al. 2016). Obdobně bylo zjištěno, že záměna aspartátu 296 za histidin (D296H), která leží rovněž v linker regionu, snižuje rezistenci buněk k různým cytostatikům (jednalo se o tyrosin kinázové inhibitory). U této alelické varianty byla zjištěna i snížená exprese proteinu (Skoglund et al. 2014). V souladu s těmito zjištěními a zejména s prací Macalou et al. (2016) se zdá, že mutace (v tomto případě přímo

delece) má vliv na transport substrátu a také na ATPázovou aktivitu. Jelikož se námi testovaná delece lysinu 360 nachází v těsné blízkosti C2-motivu, je zřejmé že tato oblast reguluje přenos konformační změny, vyvolané hydrolýzou ATP na další části proteinu, které jsou zodpovědné za vazbu substrátu a jeho eflux. Rozpor mezi mojí funkční studií a experimentem na membránových váčkách (Toyoda et al. 2019) si vysvětluji nejspíš jako artefakt způsobený velkými směrodatnými odchylkami v aktivitě zjištěné uvnitř membránových váčků. Na rozdíl od mutací v C2-motivu, delece lysinu 360 zvýšila ATPázovou aktivitu. Je možné, že je to vlivem ztráty kladně nabitého lysinu, který může elektrostaticky interagovat s vázaným ATP, fosfátem nebo s částí nukleotid vázající domény. U pacientů s hyperurikemií a dnou se delece lysinu 360 sice vyskytuje, ale vzhledem k téměř nezměněné transportní kapacitě lze uvažovat spíš o tom, že její výskyt spolu s výskytem hyperurikemie je náhodný. Zvýšená sérová hladina urátu může být tedy způsobena spíš jiným patologickým mechanismem. Vzhledem k rozporným výsledkům by bylo vhodné transportní funkci znovu nezávisle ověřit.

Haplotyp D620N byl nalezen u České kohorty pacientů s dnou. Záměna aspartátu 620 za asparagin se v námi provedené transportní studii projevuje nesignifikantně mírně sníženou transportní schopností ABCG2, což má za následek zvýšení koncentrace radioaktivně značené kyseliny močové v oocyту ve srovnání s divokou variantou ABCG2. Snížení transportní aktivity jsem stanovil na 82,7 % aktivity wild type varianty. Po desetiminutové inkubaci v médiu bez urátu jsem zjistil pokles aktivity v cytoplazmě oocyту. U této varianty jsem detekoval ABCG2 v celkovém lyzátu oocyту a to přibližně ve stejném množství jako u wt varianty ABCG2. Testováním na membránových váčkách bylo zjištěno, že záměna tohoto aspartátu za asparagin způsobuje snížení transportu urátu na 80 % aktivity divoké varianty (Toyoda et al. 2019). Můžeme tedy říct, že naše pozorování u této varianty se shoduje s experimentem provedeným na invertovaných membránových váčkách. Aspartát 620 se nalézá v extracelulární smyčce proteinu ABCG2. Vethanayagam et al. (2005) zjistili u této varianty nárůst exprese 2,4-krát vyšší než u wild type varianty. Transport cytostatika mitoxantronu byl asi o 50 % snížen oproti divoké variantě, stejně jako ATPázová aktivita mutovaného proteinu. Stejně tak byl snížen transport u varianty N590Y (Vethanayagam et al. 2005). Další studie potvrdila snížení transportu metotrexátu na 61 % transportu wild type varianty. U varianty N590Y došlo rovněž ke snížení účinnosti transportu (A. Tamura et

al. 2006). Můžeme předpokládat, že extracelulární smyčka napomáhá vazbě substrátu a jeho efluxu do extracelulárního prostředí. Při záměně některé z aminokyselin dochází ke snížení efluxu substrátu. Na základě mého experimentu a z experimentu provedeném Toyodou et al. (2019) se zdá, že aspartát 620 je jednou z podstatných aminokyselin zodpovědných za vazbu urátu. Protože však není eflux urátu inihbován je zřejmé, že vazbu urátu na transmembránové části mají na svědomí i jiné aminokyselinové zbytky. Snížení ATPázové aktivity může být důsledkem nesprávné vazby substrátu na extracelulární smyčku pod vlivem konformační změny. I u této varianty je zmenšení transportní kapacity relativně malé, a proto je možné, že její výskyt u pacientů s dnou je spíš náhodný, případně spojený s jinou, další patologií.

Poslední námi testovaná varianta byla, stejně jako ostatní, nalezena u české kohorty pacientů s dnou (Stiburkova et al. 2017). Jedná se o mutaci v sekvenci ABCG2, která je nejvíce zastoupena v lidské populaci (Zamber et al. 2003; Kobayashi et al. 2005). Transportér ABCG2 nesoucí záměnu valinu 12 za methionin (V12M) vykazovala v naší funkční studii nesignifikantně sníženou schopnost ABCG2 transportovat kyselinu močovou (71,8 % aktivity wild type varianty), což se projevilo zvýšenou koncentrací radioaktivně značené kyseliny močové v oocytech oproti wild type variantě ABCG2. Funkční studie, která byla provedena na membránových váčcích z buněk HEK293, ukázala prakticky stejnou transportní aktivitu varianty V12M jako varianty divoké (Ichida et al. 2009). Tento výsledek byl potvrzen v další funkční studii založené také na invertovaných membránových váčcích, kde byla potvrzena prakticky nezměněná transportní funkce (Higashino et al. 2017). Také transport cytostatik jako je topotecan, metotrexát či substrátů estrogen sulfát, paraminohyppurát, dehydroepiandrosteron nebyl touto variantou nijak narušen (Imai et al. 2002; Kondo et al. 2004). Analýza exprese v oocytech pomocí Western blotu ukázala stejnou expresi jako u wild type varianty ABCG2. Také literární údaje potvrzují stejnou míru exprese v buňkách transfekovaných touto variantou ABCG2 (Imai et al. 2002). U buněk LLC-PK1 se protein nalézá na apikální membráně ve stejném množství jako wild type (Kondo et al. 2004). Mnou zjištěná úroveň transportu urátu touto variantou je nižší než u wild type varianty, což je na první pohled v rozporu s literárními údaji. Jako nejpravděpodobnější vysvětlení se zdá být to, že hodnoty transportu wild type ABCG2 mají relativně velký rozptyl, stejně jako hodnoty transportu V12M. Tyto odchylky jsou způsobeny nízkou aktivitou měkkého zářiče C14 použitého pro označení kyseliny močové. Lze tedy říci,

že snížení aktivity V12M a wild type varianty je nakonec menší než výše uvedených 75 %. V souladu s citovanými literárními údaji lze předpokládat, že aminokyselinové záměny na N-konci proteinu ABCG2 nemění aktivitu proteinu. Na základě provedené studie nelze kvůli rozporům s literaturou rozhodnout, zda skutečně mění transport kyseliny močové a nebo ne. Varianta byla sice detekována u hyperurikemiků z české populace, ale s přihlédnutím k publikovaným pracem se zdá, že není příčinou vzniku dny a nárůstu koncentrace urátu v séru (Stiburkova et al. 2017).

Naši hypotézou bylo, zda uvedené alelické varianty mohou způsobovat vznik hyperurikemie a dny prostřednictvím snížení exkrece kyseliny močové na apikální membráně epitelálních buněk proximálního tubulu. Testované alelické varianty transportéru ABCG2, představující jednobodové aminokyselinové záměny v primární struktuře, Q141K, R147W, S572R, F373C, T434M a S476P mohou snižovat jeho transportní schopnost a tak tedy zvyšovat koncentraci kyseliny močové v séru nad její limitní hodnotu a podílet se na vzniku dny. Naopak u záměny D620 se zdá, že neovlivňuje transportní kapacitu proteinu ABCG2 a tak zřejmě přímo nezpůsobuje zvýšení koncentrace kyseliny močové v séru a s tím souvisejících chorob. Jako vysvětlení je možné předpokládat, že výskyt těchto variant současně s dnavými onemocněními je náhodný nebo je ve vztahu mezi expresí dané alelické varianty ABCG2 a rozvojem hyperurikemie jiný mechanismus, než je přenos urátu tímto transportérem. Výsledky funkčních studií s alelickými variantami V12M, delK360 a T153M nejsou v souladu s dostupnými literárními údaji, popřípadě se projevují neočekávaným způsobem, a tudíž nelze s jistotou říct, jestli jejich výskyt skutečně koreluje s výskytem hyperurikemie nebo dny. U těchto variant by bylo nutné opětovné ověření, nejlépe s využitím jiné metodiky.

7. Závěr

Provedl jsem funkční studii alelických variant transportéru ABCG2, které byly rámci genu *ABCG2* identifikovány jako podezřelé ze souvislosti s dnou Stibůrková et al.2017. Testování transportní kapacity kyseliny močové jsem provedl na modelu nematurovaných oocytů žáby *Xenopus laevis* exprimujících danou alelickou variantu transportéru ABCG2 (BCRP) a pomocný transportér URAT1 (SLC22A12), který zajišťoval aktivní uptake kyseliny močové. Průkaz exprese jsem pro každou variantu provedl pomocí imunoblotovacích technik. Varianty Q141K, R147W, S572R, F373C, T434M a S476P mají sníženou schopnost transportovat urát *in vitro* což naznačuje, že jsou pravděpodobně zodpovědné za rozvoj dny. Varianta D620N nemá sníženou transportní kapacitu pro urát a zřejmě tak není přímo odpovědná za vznik dny. U variant V12M, del K360 a T153M není na základě naší studie možné rozhodnout o jejich přímém vlivu na vznik dny a bude u nich nutné další testování.

8. Literatura

*** sekundární zdroj.

- Adachi, Yasuhisa, Hiroshi Suzuki, Alfred H Schinkel, and Yuichi Sugiyama. 2005. "Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) in the Extrusion of Glucuronide and Sulfate Conjugates from Enterocytes to Intestinal Lumen." *Molecular Pharmacology* 67 (3): 923–28.
- Akiyama, Masayuki S, Hirotaka M Atsuo, Seiko S Himizu, Hiroshi N Akashima, Akiyoshi N Akayama, Toshinori C Hiba, Mariko N Aito, et al. 2014. "A Common Variant of Organic Anion Transporter 4 (OAT4 / SLC22A11) Gene Is Associated with Renal Underexcretion Type Gout" 29 (2): 208–10..
- Allen, John D, Arnold Van Loevezijn, Jeany M Lakhai, Martin Van Der Valk, Olaf Van Tellingen, Glen Reid, Jan H M Schellens, Gerrit-jan Koomen, and Alfred H Schinkel. 2002. "Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C." *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (April): 417–25.
- Ames, Bruce N, Richard Cathcart, Elizabeth Schwiers, and Paul Hochsteint. 1981. "Uric Acid Provides an Antioxidant Defense in Humans against Oxidant-and Radical-Caused Aging and Cancer: A Hypothesis (Lipid Peroxidation/ascorbic Acid/primate Evolution/erythrocyte Aging)." *Proc. NatL Acad. Sci. USA* 78 (11): 6858–62.
- Aronica, Eleonora, Jan A. Gorter, Sandra Redeker, Erwin A. Van Vliet, Marja Ramkema, George L. Scheffer, Rik J. Scheper, et al. 2005. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain." *Epilepsia* 46 (6): 849–57.
- Aubel, Rémon A. M. H. Van, Pascal H. E. Smeets, Jeroen J. M. W. van den Heuvel, and Frans G. M. Russel. 2004. "Human Organic Anion Transporter MRP4 (ABCC4) Is an Efflux Pump for the Purine End Metabolite Urate with Multiple Allosteric Substrate Binding Sites." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 288 (2): F327–33.
- Auberson, Muriel, Sophie Stadelmann, Candice Stoudmann, Klaus Seuwen, Robert Koesters, Bernard Thorens, and Olivier Bonny. 2018. "SLC2A9 (GLUT9) Mediates Urate Reabsorption in the Mouse Kidney." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 470 (12). Pflügers Archiv - European Journal of Physiology: 1739–51.
- Augustin, Robert, Mary O. Carayannopoulos, Lia O. Dowd, John E. Phay, Jeffrey F. Moley, and Kelle H. Moley. 2004. "Identification and Characterization of Human Glucose Transporter-like Protein-9 (GLUT9)." *Journal of Biological Chemistry* 279 (16): 16229–36.
- Bahn, Andrew, Dirk Prawitt, Diana Buttler, Glen Reid, Thorsten Enklaar, Natascha A Wolff, Christian Ebbinghaus, et al. 2000. "Genomic Structure and in Vivo Expression of the Human Organic Anion Transporter 1 (hOAT1) Gene" 630: 623–30.
- Bailey-Dell, K J, B Hassel, L a Doyle, and D D Ross. 2001. "Promoter Characterization and Genomic Organization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (ATP-Binding Cassette Transporter G2) Gene." *Biochim Biophys Acta* 1520 (3): 234–41.
- Bart, J., H. Hollema, H. J M Groen, E. G E De Vries, N. H. Hendrikse, D. T. Sleijfer,

- T. D. Wegman, W. Vaalburg, and W. T A Van Der Graaf. 2004. "The Distribution of Drug-Efflux Pumps, P-Gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the Normal Blood-Testis Barrier and in Primary Testicular Tumours." *European Journal of Cancer* 40 (14): 2064–70.
- Basit, Abdul, C.Y. Li, Anshul Gupta, Zsuzsanna Gáborik, Emese Kis, and Bhagwat Prasad. 2019. "Major Glucuronide Metabolites of Testosterone Are Primarily Transported by MRP2 and MRP3 in Human Liver, Intestine and Kidney." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 191. Elsevier Ltd.
- Blazquez, Alba G, Oscar Briz, Marta R Romero, Ruben Rosales, Maria J Monte, Javier Vaquero, Rocio I R Macias, Doris Cassio, and Jose J G Marin. 2012. "Characterization of the Role of ABCG2 as a Bile Acid Transporter in Liver and Placenta." *Molecular Pharmacology* 81 (2): 273–83.
- Bobulescu, Ion Alexandru, and Orson W. Moe. 2012. "Renal Transport of Uric Acid: Evolving Concepts and Uncertainties." *Advances in Chronic Kidney Disease* 19 (6): 358–71. ***
- Bonny, Olivier, Alexandra Laverrie, Samuel Rotman, Dmitri Firsov, and Anabela Da. 2009. "Glut9 Is a Major Regulator of Urate Homeostasis and Its Genetic Inactivation Induces Hyperuricosuria and Urate Nephropathy." *PNAS* 106 (36): 15501–6.
- Brady, Kevin P., Holly Dushkin, Dorothee Förmzler, Tatsuya Koike, Fiona Magner, Helen Her, Steven Gullans, Gino V. Segre, Richard M. Green, and David R. Beier. 1999. "A Novel Putative Transporter Maps to the Osteosclerosis (Oc) Mutation and Is Not Expressed in the Oc Mutant Mouse." *Genomics* 56 (3): 254–61.
- Brechbuhl, Heather M., Neal Gould, Remy Kachadourian, Wayne R. Riekhof, Dennis R. Voelkerand, and Brian J. Day. 2010. "Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-Binding Cassette Protein ABCG2." *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 16582–87.
- Bridges, Christy C, Rudolfs K Zalups, Lucy Joshee, and -. 2015. "Toxicological Significance of Renal Bcrp: Another Potential Transporter in the Elimination of Mercuric Ions from Proximal Tubular Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 285: 110–17.
- Ceckova, Martina, Antonin Libra, Petr Pavek, Petr Nachtigal, Marianne Brabec, Renate Fuchs, and Frantisek Staud. 2006. "Expression and Functional Activity of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp , Abcg2) Transporter in the Human." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 58–65.
- Claverie-Martin, Felix, Jorge Trujillo-Suarez, Hilaria Gonzalez-Acosta, Cristina Aparicio, Maria L. Justa Roldan, Blanka Stiburkova, Kimiyoshi Ichida, et al. 2018. "URAT1 and GLUT9 Mutations in Spanish Patients with Renal Hypouricemia." *Clinica Chimica Acta* 481 (2017). Elsevier B.V: 83–89.
- Custer, Maria, Felix Meier, Eberhard Schlatter, Rainer Greger, Arlyn Garcia-Perez, Jürg Biber, and Heini Murer. 1993. "Localization of NaPi-1, a Na-Pi Cotransporter, in Rabbit Kidney Proximal Tubules - I. mRNA Localization by Reverse Transcription/polymerase Chain Reaction." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 424 (3–4): 203–9.
- Dankers, Anita C A, Fred C G J Sweep, Jeanne C L M Pertijs, Vivienne Verweij, Jeroen J M W Van Den Heuvel, Jan B. Koenderink, Frans G M Russel, and Rosalinde Masereeuw. 2012. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp) in Endocrine Organs and Inhibition of Its Transport Activity by Steroid Hormones." *Cell and Tissue Research* 349 (2): 551–63.

- Dehghan, Abbas, Anna Köttgen, Qiong Yang, W H Linda Kao, Fernando Rivadeneira, Daniel Levy, Albert Hofman, et al. 2008. "Association of Three Genetic Loci with Uric Acid Concentration and Risk of Gout: A Genome-Wide Association Study." *Lancet* 372 (9654): 1953–61.
- Demont, J.N. 1972. "Oogenesis in *Xenopus Laevis* (Daudin)." *J.Morph* 136: 153–80.
- Deppe, Sylvia, Anne Ripperger, Johanna Weiss, Süleyman Ergün, and Ralf A. Benndorf. 2014. "Impact of Genetic Variability in the ABCG2 Gene on ABCG2 Expression, Function, and Interaction with AT1 Receptor Antagonist Telmisartan." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443 (4). Elsevier Inc.: 1211–17.
- Desuzinges-mandon, Elodie, Lorena Martinez, Attilio Di Pietro, and Pierre Falson. 2010. "ABCG2 Transports and Transfers Heme to Albumin through Its Large Extracellular Loop." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 285 (43): 33123–33.
- Ding, Rui, Jia Shi, Kirk Pabon, and Kathleen W Scotto. 2012. "Xanthines Down-Regulate the Drug Transporter ABCG2 and Reverse Multidrug Resistance." *Molecular Pharmacology* 81 (3): 328–37.
- Döring, Angela, Christian Gieger, Divya Mehta, Henning Gohlke, Holger Prokisch, Stefan Coassin, Guido Fischer, et al. 2008. "SLC2A9 Influences Uric Acid Concentrations with Pronounced Sex-Specific Effects." *Nature Genetics* 40 (March). Nature Publishing Group: 430.
- Doyle, L Austin, Douglas D Ross, -, and -. 1998. "A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Doyle, L Austin, Weidong Yang, Lynne V Abruzzo, Tammy Krogmann, Yongming Gao, Arun K Rishi, and Douglas D Ross. 1998. "A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15665–70.
- Du, Y., P.Ch. Chen, Ch. Tseng, Y. Eisenberg, and B.L. Firestein. 2007. "Astroglia-Mediated Effects of Uric Acid to Protect Spinal Cord Neurons from Glutamate Toxicity." *Glia* 55: 463–72.
- Ebert, Bettina, Albrecht Seidel, Alfonso Lampen, and -. 2005. "Identification of BCRP as Transporter of Benzo[a]pyrene Conjugates Metabolically Formed in Caco-2 Cells and Its Induction by Ah-Receptor Agonists." *Carcinogenesis* 26 (10): 1754–63.
- Ekaratanawong, Sophapun, Naohiko Anzai, Promsuk Jutabha, Hiroki Miyazaki, and Rie Noshiro. 2004. "Human Organic Anion Transporter 4 Is a Renal Apical Organic Anion / Dicarboxylate Exchanger in the Proximal Tubules" 304: 297–304.
- Enomoto, Atsushi, Hiroaki Kimura, Arthit Chairoungdua, Yasuhiro Shigeta, Promsuk Jutabha, Seok Ho Cha, Makoto Hosoyamada, et al. 2002. "Molecular Identification of a Renal Urate–anion Exchanger That Regulates Blood Urate Levels." *Nature* 417 (6887): 447–52..
- Eraly, Satish A., Volker Vallon, Duke A. Vaughn, Jon A. Gangoiti, Kerstin Richter, Megha Nagle, Julio C. Monte, et al. 2006. "Decreased Renal Organic Anion Secretion and Plasma Accumulation of Endogenous Organic Anions in OAT1 Knock-out Mice." *Journal of Biological Chemistry* 281 (8): 5072–83.
- Eraly, Satish A, Bruce A Hamilton, and Sanjay K Nigam. 2003. "Organic Anion and Cation Transporters Occur in Pairs of Similar and Similarly Expressed Genes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 333–42.
- Eraly, Satish A, V. Vallon, T. Rieg, and A.J. Gangoiti. 2008. "Multiple Organic Anion

- Transporters Contribute to Net Renal Excretion of Uric Acid." *Physiol Genomics* 128.
- Feig, Daniel I., Duk-Hee Kang, and R.J. Johnson. 2008. "Uric Acid and Cardiovascular Risk." *New England Journal of Medicine* 359 (17): 1811–21. ***
- Fetsch, Patricia A., Andrea Abati, Thomas Litman, Kuniaki Morisaki, Yasumasa Honjo, Khush Mittal, and Susan E. Bates. 2006. "Localization of the ABCG2 Mitoxantrone Resistance-Associated Protein in Normal Tissues." *Cancer Letters* 235 (1): 84–92.
- Furukawa, Tomoka, Kanako Wakabayashi, Ai Tamura, Hiroshi Nakagawa, Moroshima Yoshihiro, Osawa Yoichi, and Toshihisa Ishikawa. 2009. "Major SNP (Q141K) Variant of Human ABC Transporter ABCG2 Undergoes Lysosomal and Proteasomal Degradations." *Bioorg Med Chem Lett.* 19 (21): 6218–21.
- Gál, Zita, Csilla Hegedüs, Gergely Szakács, András Váradi, Balázs Sarkadi, and Csilla Özvegy-Laczka. 2015. "Mutations of the Central Tyrosines of Putative Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus (CRAC) Sequences Modify Folding, Activity, and Sterol-Sensing of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848 (2). Elsevier B.V.: 477–87.
- Ganguly, Samit, John C Panetta, Jessica K Roberts, and Erin G Schuetz. 2018. "Ketamine Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Are Altered by Pgp and Bcrp Efflux Transporters in Mice." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 1014–22.
- Glazer, Nicole L, Huei Chen, Daniel I Chasman, Michael Nalls, Dena Hernandez, Dan E Arking, and Eric Boerwinkle. 2012. "Multiple Genetic Loci Influence Serum Urate and Their Relationship with Gout and Cardiovascular Disease Risk Factors" 3 (6): 523–30.
- Goodell, By Margaret A, Katja Brose, Glenn Paradis, A Stewart Conner, and Richard C Mulligan. 1996. "Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replacable In Vivo By Margaret A. Goodell, Katja Brose, Glenn Paradis,* A. Stewart Conner,* and Richard C. Mulligan" 183 (April).
- Gutmann, Heike, Petr Hruz, Christian Zimmermann, Christoph Beglinger, and Juergen Drewe. 2005. "Distribution of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) mRNA Expression along the Human GI Tract." *Biochemical Pharmacology* 70 (5): 695–99.
- Hagos, Yohannes, Daniel Stein, Bernhard Ugele, Gerhard Burckhardt, and Andrew Bahn. 2007. "Human Renal Organic Anion Transporter 4 Operates as an Asymmetric Urate Transporter." *J Am Soc Nephrol* 18 (17): 430–39.
- Haider, A. J., M. H. Cox, N. Jones, A. J. Goode, K. S. Bridge, K. Wong, D. Briggs, and I. D. Kerr. 2015. "Identification of Residues in ABCG2 Affecting Protein Trafficking and Drug Transport, Using Co-Evolutionary Analysis of ABCG Sequences." *Bioscience Reports* 35 (4): e00241–e00241.
- Hamada, Shin, Kennichi Satoh, Morihisa Hirota, Atsushi Kanno, Jun Umino, Hiromichi Ito, Atsushi Masamune, Kazuhiro Kikuta, Kiyoshi Kume, and Tooru Shimosegawa. 2012. "The Homeobox Gene MSX2 Determines Chemosensitivity of Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of Transporter Gene ABCG2." *Journal of Cellular Physiology* 227 (2): 729–38.
- Henriksen, Ulla, Ulrik Gether, Thomas Litman, -, and -. 2005. "Effect of Walker A Mutation (K86M) on Oligomerization and Surface Targeting of the Multidrug Resistance Transporter ABCG2." *Journal of Cell Science* 118: 1417–26.

- Hershfield, M. S., L. J. Roberts, N. J. Ganson, S. J. Kelly, I. Santisteban, E. Scarlett, D. Jagers, and J. S. Sundry. 2010. "Treating Gout with Pegloticase, a PEGylated Urate Oxidase, Provides Insight into the Importance of Uric Acid as an Antioxidant in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (32): 14351–56.
- Herwaarden, Antonius E. van, Els Wagenaar, Barbara Karnekamp, Gracia Merino, Johan W. Jonker, and Alfred H. Schinkel. 2006. "Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2) Reduces Systemic Exposure of the Dietary Carcinogens Aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but Also Mediates Their Secretion into Breast Milk." *Carcinogenesis* 27 (1): 123–30.
- Herwaarden, Antonius E van, Els Wagenaar, Gracia Merino, Johan W Jonker, Hilde Rosing, Jos H Beijnen, and Alfred H Schinkel. 2007. "Multidrug Transporter ABCG2/breast Cancer Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B2) into Milk." *Molecular and Cellular Biology* 27 (4): 1247–53.
- Higashino, Toshihide, Tappei Takada, Hirofumi Nakaoka, Yu Toyoda, Blanka Stiburkova, Hiroshi Miyata, Yuki Ikebuchi, et al. 2017. "Multiple Common and Rare Variants of ABCG2 Cause Gout." *RMD Open* 3 (2): 1–8.
- Honjo, Yasumasa, Kuniaki Morisaki, Lyn Mickley Huff, Robert W. Robey, Jeffrey Hung, Michael Dean, and Susan E. Bates. 2002. "Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis in the ABC Half-Transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1)." *Cancer Biology and Therapy* 1 (6): 696–702.
- Hoppe, S. van, Rolf W. Sparidans, Els Wagenaar, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2017. "Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and P-Glycoprotein (P-gp/ABCB1) Transport Afatinib and Restrict Its Oral Availability and Brain Accumulation." *Pharmaceutical Research* 120. Elsevier Ltd: 43–50.
- Hoque, M., Olena Kis, María F. De Rosa, and Reina Bendayan. 2015. "Raltegravir Permeability across Blood-Tissue Barriers and the Potential Role of Drug Efflux Transporters." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (5): 2572–82.
- Hoque, Md. Tozammel, Arpit Shah, Vijay More, David S Miller, and Reina Bendayan. 2015. "In Vivo and Ex Vivo Regulation of Breast Cancer Resistant Protein (Bcrp) by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (Ppar α) at the Blood-Brain Barrier." *Journal of Neurochemistry* 28 (10): 1304–14.
- Hosomi, Atsushi, Takeo Nakanishi, Takuya Fujita, and Ikumi Tamai. 2012. "Extra-Renal Elimination of Uric Acid via Intestinal Efflux Transporter BCRP/ABCG2." *PLoS ONE* 7 (2): 2–9.
- Hosoyamada, M., Y. Takiue, H. Morisaki, J. Cheng, M. Ikawa, M. Okabe, T. Morisaki, K. Ichida, T. Hosoya, and T. Shibasaki. 2010. "Establishment and Analysis of SLC22A12 (URAT1) Knockout Mouse." *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 29 (4–6): 314–20.
- Hosoyamada, Makoto, Takashi Sekine, Yoshikatsu Kanai, and Hitoshi Endou. 1999. "Molecular Cloning and Functional Expression of a Multispecific Organic Anion Transporter from Human Kidney." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 276 (1): F122–28.
- Huls, M., C.D.A. Brown, A.S. Windass, R. Sayer, J.J.M.W. van den Heuvel, S. Heemskerk, F.G.M. Russel, and R. Masereeuw. 2008. "The Breast Cancer Resistance Protein Transporter ABCG2 Is Expressed in the Human Kidney Proximal Tubule Apical Membrane." *Kidney International* 73 (2). Elsevier Masson SAS: 220–25.
- Hwang, Jin-Sun, Eun-Young Park, Wan-Young Kim, Chul-Woo Yang, and Jin Kim. 2010. "Expression of OAT1 and OAT3 in Differentiating Proximal Tubules of the

- Mouse Kidney." *Histology and Histopathology* 25 (1). Spain: 33–44.
- Cha, Seok Ho, Takashi Sekine, Hiroyuki Kusuhashi, Erkang Yu, Ju Young Kim, Do Kyung Kim, Yuichi Sugiyama, Yoshikatsu Kanai, and Hitoshi Endou. 2000. "Molecular Cloning and Characterization of Multispecific Organic Anion Transporter 4 Expressed in the Placenta " 275 (6): 4507–12.
- Chiba, Toshinori, Hirotaka Matsuo, Yusuke Kawamura, Shushi Nagamori, Takashi Nishiyama, Ling Wei, Akiyoshi Nakayama, et al. 2015. "NPT1/SLC17A1 Is a Renal Urate Exporter in Humans and Its Common Gain-of-Function Variant Decreases the Risk of Renal Underexcretion Gout." *Arthritis and Rheumatology* 67 (1): 281–87.
- Chong, S. S., C. A. Kozak, L. Liu, K. Kristjansson, S. T. Dunn, J. E. Bourdeau, and M. R. Hughes. 1994. "Cloning, Genetic Mapping, and Expression Analysis of a Mouse Renal Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 268 (6): F1038–45.
- Chong, S.S., Kristleifur Kristjansson, R.Hughes, and Huda Y.Zoghbi. 1993. "Molecular Cloning of the cDNA Encoding a Human Renal Sodium Phosphate Transport Protein and Its Assignment to Chromosome 6p21.3-p23." *Genomics* 18: 355–59.
- Ifergan, Ilan, Assaf Shafran, Gerrit Jansen, Jan Hendrik Hooijberg, George L. Scheffer, and Yehuda G. Assaraf. 2004. "Folate Deprivation Results in the Loss of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Expression: A Role for BCRP in Cellular Folate Homeostasis." *Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25527–34.
- Iharada, Masafumi, Takaaki Miyaji, Takahiro Fujimoto, Miki Hiasa, Naohiko Anzai, Hiroshi Omote, and Yoshinori Moriyama. 2010. "Type 1 Sodium-Dependent Phosphate Transporter (SLC17A1 Protein) Is a Cl⁻-Dependent Urate Exporter." *Journal of Biological Chemistry* 285 (34): 26107–13.
- Ichida, Kimiyoshi, Makoto Hosoyamada, Ichiro Hisatome, Atsushi Enomoto, Miho Hikita, Hitoshi Endou, and Tatsuo Hosoya. 2004. "Clinical and Molecular Analysis of Patients with Renal Hypouricemia in Japan-Influence of URAT1 Gene on Urinary Urate Excretion." *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (1): 164–73.
- Ichida, Kimiyoshi, Hirotaka Matsuo, Tappei Takada, Takahiro Nakamura, Akiyoshi Nakayama, Yuki Ikebuchi, Kousei Ito, et al. 2009. "Common Defects of ABCG2, a High-Capacity Urate Exporter, Cause Gout: A Function-Based Genetic Analysis in a Japanese Population." *Science Translational Medicine* 1 (5): 5ra11 LP-5ra11.
- Imai, Yasuo, Sakiyo Asada, Satomi Tsukahara, Etsuko Ishikawa, Takashi Tsuruo, Molecular Biotherapy, and Experimental Chemotherapy T T. 2003. "Breast Cancer Resistance Protein Exports Sulfated Estrogens but Not Free Estrogens" 64 (3): 610–18.
- Imai, Yasuo, Etsuko Ishikawa, Sakiyo Asada, and Yoshikazu Sugimoto. 2005. "Estrogen-Mediated Post Transcriptional down-Regulation of Breast Cancer Resistance protein/ABCG2." *Cancer Research* 65 (2): 596–604.
- Imai, Yasuo, Minoru Nakane, Kumie Kage, Satomi Tsukahara, Etsuko Ishikawa, Takashi Tsuruo, Yoshio Miki, and Yoshikazu Sugimoto. 2002. "C421A Polymorphism in the Human Breast Cancer Resistance Protein Gene Is Associated with Low Expression of Q141K Protein and Low-Level Drug Resistance." *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (8): 611–16.
- Ishikawa, T, H Hirano, H Saito, K Sano, Y Ikegami, N Yamaotsu, and S Hirono. 2012.

- "Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Analysis to Predict Drug-Drug Interactions of ABC Transporter ABCG2," 505–14.
- Izuarai, Shinji M, Naohiko A Ozasa, Hidehito K Otani, and -. 2004. "Single Nucleotide Polymorphisms Result in Impaired Membrane Localization and Reduced Atpase Activity in Multidrug Transporter ABCG2." *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 246 (April 2003): 238–46.
- Jonker, Johan W, Marije Buitelaar, Els Wagenaar, Martin a Van Der Valk, George L Scheffer, Rik J Scheper, Torsten Plosch, et al. 2002. "The Breast Cancer Resistance Protein Protects against a Major Chlorophyll-Derived Dietary Phototoxin and Protoporphyrin." *PNAS* 99 (24): 15649–54.
- Kage, Kumie, Toshiro Fujita, and Yoshikazu Sugimoto. 2005. "Role of Cys-603 in Dimer / Oligomer Formation of the Breast Cancer Resistance Protein BCRP / ABCG2." *Cancer Sci* 96: 866–72.
- Kage, Kumie K, Satomi T Sukahara, Tomomi S Ugiyama, Sakiyo A Sada, Etsuko I Shikawa, and Takashi T Suruo. 2002. "Dominant-Negative Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein as Drug Efflux Pump through the Inhibition of S-S Dependent Homodimerization." *International Journal of Cancer* 630: 626–30.
- Kawabata, Shigeru, Mikio Oka, Ken Shiozawa, Kazuhiro Tsukamoto, Katsumi Nakatomi, Hiroshi Soda, Minoru Fukuda, et al. 2001. "Breast Cancer Resistance Protein Directly Confers SN-38 Resistance of Lung Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1223: 1216–23.
- Kim, K.M., N.G. Henderson, F.R. Frye, and D.Ch. Galloway. 2009. "Simultaneous Determination of Uric Acid Metabolites Allantoin, 6- Aminouracil, and Triuret in Human Urine Using Liquid Chromatography–mass Spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (8): 65–70.
- Knutsen, Turid, V. Koneti Rao, Thomas Ried, Lyn Mickley, Erasmus Schneider, Keisuke Miyake, B. Michael Ghadimi, et al. 2000. "Amplification of 4q21-q22 and the MXR Gene in Independently Derived Mitoxantrone-Resistant Cell Lines." *Genes Chromosomes and Cancer* 27 (1): 110–16.
- Kobayashi, Daisuke, Ichiro Ieiri, Takeshi Hirota, Hiroshi Takane, Shinji Maegawa, Junzo Kigawa, H Suzuki, et al. 2005. "Functional Assessment of ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms to Protein Expression in Human Placenta." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 33 (1): 94–101.
- Kolz, Melanie, Toby Johnson, Serena Sanna, Alexander Teumer, Veronique Vitart, Markus Perola, Massimo Mangino, et al. 2009. "Meta-Analysis of 28,141 Individuals Identifies Common Variants within Five New Loci That Influence Uric Acid Concentrations." *PLOS Genetics* 5 (6). Public Library of Science: e1000504.
- Kondo, Chihiro, Hiroshi Suzuki, Masaya Itoda, Shogo Ozawa, Jun-Ichi Sawada, Daisuke Kobayashi, Ichiro Ieiri, Kazunori Mine, Kenji Ohtsubo, and Yuichi Sugiyama. 2004. "Functional Analysis of SNPs Variants of BCRP/ABCG2." *Pharmaceutical Research* 21 (10).
- Kool, Marcel, Marcel De Haa, George L Scheffer, Rik J Scheper, Michiel J T Van Eijk, and Jenneke a Juijn. 1997. "Of the Multidrug Resistance-Associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines." *Cancer Research* 57 (May 2014): 3537–47.
- Kort, Anita, Rolf W. Sparidans, Els Wagenaar, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. 2015. "Brain Accumulation of the EML4-ALK Inhibitor Ceritinib Is Restricted by P-Glycoprotein (P-GP/ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)." *Pharmacological Research* 102: 200–207.

- Köttgen, Anna, Eva Albrecht, Alexander Teumer, Veronique Vitart, Claudia Hundertmark, Giorgio Pistis, Daniela Ruggiero, and M Conall. 2013. "Genome-Wide Association Analyses Identify 18 New Loci Associated with Serum Urate Concentrations." *Nat Genet.* 45 (2): 145–54.
- Kranz, Jasmin, Stefanie Hessel, Julia Aretz, Albrecht Seidel, Ernst Petzinger, Joachim Geyer, and Alfonso Lampen. 2014. "The Role of the Efflux Carriers Abcg2 and Abcc2 for the Hepatobiliary Elimination of Benzo[a]pyrene and Its Metabolites in Mice." *Chemico-Biological Interactions* 224. Elsevier Ireland Ltd: 36–41.
- Kratzer, James T., Miguel A. Lanaspá, Michael N. Murphy, Christina Cicerchi, Christina L. Graves, Peter A. Tipton, Eric A. Ortlund, Richard J. Johnson, and Eric A. Gaucher. 2014. "Evolutionary History and Metabolic Insights of Ancient Mammalian Uricases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (10): 3763–68.
- Krishnamurthy, Partha, Douglas D. Ross, Takeo Nakanishi, Kim Bailey-Dell, Sheng Zhou, Kelly E. Mercer, Balázs Sarkadi, Brian P. Sorrentino, and John D. Schuetz. 2004. "The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme." *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24218–25.
- Kuo, Chang Fu, Matthew J. Grainge, Christian Mallen, Weiya Zhang, and Michael Doherty. 2015. "Rising Burden of Gout in the UK but Continuing Suboptimal Management: A Nationwide Population Study." *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (4): 661–67.
- Lagas, Jurjen S, Robert a B van Waterschoot, Rolf W Sparidans, Els Wagenaar, Jos H Beijnen, and Alfred H Schinkel. 2010. "Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Limit Sorafenib Brain Accumulation." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (2): 319–26.
- Lai, Liqi, and Theresa M. C. Tan. 2002. "Role of Glutathione in the Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4)-Mediated Efflux of cAMP and Resistance to Purine Analogues." *Biochemical Journal* 361 (3): 319–26.
- László, Laura, Balázs Sarkadi, Tamás Hegedűs, -, and -. 2016. "Jump into a New Fold—A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter." *PLOS ONE* 11 (10). Public Library of Science: 1–22.
- Lawrence, Reva C., D. T. Felson, C. G Helmick, L. M Arnold, Hyon Choi, Richard A Deyo, and Joanne M Jordan. 2008. "Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States: Part II." *Arthritis and Rheumatism* 58 (1): 26–35.
- Lee, Sang Seop, Hye-Eun Jeong, Joo-Mi Yi, Hyun-Ju Jung, Jae-Eun Jang, Eun-Young Kim, Su-Jun Lee, and Jae-Gook Shin. 2007. "Identification and Functional Assessment of BCRP Polymorphisms in a Korean Population." *Drug Metabolism and Disposition* 35 (4): 623 LP-632.
- Lee, Yoon Young Sung, Heung Joo Yuk, Eunjung Son, S. J. Lee, Jin Soo Kim, and Dong Seon Kim. 2019. "Anti-Hyperuricemic Effect of Alpinia Oxyphylla Seed Extract by Enhancing Uric Acid Excretion in the Kidney." *Phytomedicine* 62 (May). Elsevier: 152975.
- Lechner, Andreas, Colin A. Leech, Elizabeth J. Abraham, Anna L. Nolan, and Joel F. Habener. 2002. "Nestin-Positive Progenitor Cells Derived from Adult Human Pancreatic Islets of Langerhans Contain Side Population (SP) Cells Defined by Expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-Binding Cassette Transporter." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (2): 670–74.

- Li, Rui, Lei Miao, Liyan Qin, Yang Xiang, Xiaojin Zhang, Hui Peng, Mailamuguli, Yuping Sun, and Hua Yao. 2015. "A Meta-Analysis of the Associations between the Q141K and Q126X ABCG2 Gene Variants and Gout Risk." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (9): 9812–23.
- Li, Siguang, Serena Sanna, Andrea Maschio, Fabio Busonero, Gianluca Usala, Antonella Mulas, Sandra Lai, et al. 2007. "The GLUT9 Gene Is Associated with Serum Uric Acid Levels in Sardinia and Chianti Cohorts." *PLoS Genetics* 3 (11): 2156–62.
- Line, Tumor Cell, Marc Maliepaard, A Van Gastelen, Laurina A De Jong, Dick Pluim, Robert C A M Van Waardenburg, Marjan C Ruevekamp-helmers, Ben G J Floot, and Jan H M Schellens. 1999. "Overexpression of the BCRP / MXR / ABCP Gene in a Topotecan-Selected Ovarian." *Cancer Research* 59: 4559–63.
- Lopez-Nieto, Carlos E., Guofeng You, Kevin T. Bush, Elvino J.G. Barros, Davio R. Beier, and Sanjay K. Nigam. 1997. "Molecular Cloning and Characterization of NKT, a Gene Product Related to the Organic Cation Transporter Family That Is Almost Exclusively Expressed in the Kidney." *Journal of Biological Chemistry* 272 (10): 6471–78.
- Lu, Run, Brenda S. Chan, and Victor L. Schuster. 1999. "Cloning of the Human Kidney PAH Transporter: Narrow Substrate Specificity and Regulation by Protein Kinase C." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 276 (2): F295–303.
- Macalou, S., R. W. Robey, G. Jabor Gozzi, S. Shukla, I. Grosjean, T. Hegedus, S. V. Ambudkar, S. E. Bates, and A. Di Pietro. 2016. "The Linker Region of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 Is Critical for Coupling of ATP-Dependent Drug Transport." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (9). Springer International Publishing: 1927–37.
- Maliepaard, Marc, George L Scheffer, Ian F Faneyte, M A van Gastelen, A C Pijnenborg, A H Schinkel, M J van De Vijver, R J Scheper, and J H Schellens. 2001. "Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues." *Cancer Res* 61 (8): 3458–64.
- Mandal, Asim K., Adriana Mercado, Andria Foster, Kambiz Zandi-Nejad, and David B. Mount. 2017. "Uricosuric Targets of Trilast." *Pharmacology Research and Perspectives* 5 (2): 1–19.
- Martin, Cindy M., Annette P. Meeson, Scott M. Robertson, Thomas J. Hawke, James A. Richardson, Susan Bates, Sean C. Goetsch, Teresa D. Gallardo, and Daniel J. Garry. 2004. "Persistent Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter, Abcg2, Identifies Cardiac SP Cells in the Developing and Adult Heart." *Developmental Biology* 265 (1): 262–75.
- Matsuo, Hirotaka, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Toshinori Chiba, Seiko Shimizu, Yusuke Kawamura, Hiroshi Nakashima, et al. 2014. "ABCG2 Dysfunction Causes Hyperuricemia due to Both Renal Urate Underexcretion and Renal Urate Overload." *Scientific Reports* 4: 3755.
- McCarthy, Mark I, Gonçalo R Abecasis, Lon R Cardon, David B Goldstein, Julian Little, John P A Ioannidis, and Joel N Hirschhorn. 2008. "Genome-Wide Association Studies for Complex Traits: Consensus, Uncertainty and Challenges." *Nature Reviews. Genetics* 9 (5): 356–69. ***
- Miyake, Keisuke, Lyn Mickley, Thomas Litman, Zhirong Zhan, Robert Robey, Barbara Cristensen, Mariafiorella Brangi, et al. 1999. "Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-Resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes." *Cancer Research* 59 (1):

- Mizuno, Naomi, Michiko Suzuki, Hiroyuki Kusuhara, Kenji Takeuchi, Takuro Niwa, Johan W. Jonker, and Yuichi Sugiyama. 2002. "IMPAIRED RENAL EXCRETION OF 6-HYDROXY-5,7-DIMETHYL-2-METHYLAMINO-4- (3-PYRIDYLMETHYL) BENZOTHAZOLE (E3040) SULFATE IN BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP1/ABCG2) KNOCKOUT MICE" 30 (5): 483–87.
- Mizuno, Naomi, Tsuyoshi Takahashi, Hiroyuki Kusuhara, John D Schuetz, Takuro Niwa, and Yuichi Sugiyama. 2007. "Evaluation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4/ABCC4) in The Urinary Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Edaravone (MCI-186; 3-Methyl-1-Phenyl-2-Pyrazoli." *Drug Metabolism and Disposition* 35 (11): 2045 LP-2052.
- Mohrmann, Karin, Maria A J Van Eijndhoven, Alfred H. Schinkel, and Jan H M Schellens. 2005. "Absence of N-Linked Glycosylation Does Not Affect Plasma Membrane Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (4): 344–50.
- Morisaki, Kuniaki, Robert W. Robey, Csilla Özvegy-Laczka, Yasumasa Honjo, Orsolya Polgar, Kenneth Steadman, Balázs Sarkadi, and Susan E. Bates. 2005. "Single Nucleotide Polymorphisms Modify the Transporter Activity of ABCG2." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 56 (2): 161–72.
- Mutsaers, Henricus A M, Lambertus P. van den Heuvel, Lauke H J Ringens, Anita C A Dankers, Frans G M Russel, Jack F M Wetzels, Joost G. Hoenderop, and Rosalinde Masereeuw. 2011. "Uremic Toxins Inhibit Transport by Breast Cancer Resistance Protein and Multidrug Resistance Protein 4 at Clinically Relevant Concentrations." *PLoS ONE* 6 (4).
- Nakagawa, Hiroshi, Ai Tamura, Kanako Wakabayashi, Kazuyuki Hoshijima, Masayuki Komada, Takashi Yoshida, Satoshi Kometani, Takayoshi Matsubara, Kenta Mikuriya, and Toshihisa Ishikawa. 2008. "Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation of Non-Synonymous SNP Variants of Human ABC Transporter ABCG2." *The Biochemical Journal* 411 (3): 623–31.
- Nakagawa, Hiroshi, Kanako Wakabayashi-Nakao, Ai Tamura, Yu Toyoda, Shoko Koshiba, and Toshihisa Ishikawa. 2009. "Disruption of N-Linked Glycosylation Enhances Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation of the Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2." *FEBS Journal* 276 (24): 7237–52.
- Nakamichi, Naoto, Eiichi Morii, Jun Ichiro Ikeda, Ying Qiu, Suhana Mamato, Tian Tian, Shirou Fukuhara, and Katsuyuki Aozasa. 2009. "Synergistic Effect of Interleukin-6 and Endoplasmic Reticulum Stress Inducers on the High Level of ABCG2 Expression in Plasma Cells." *Laboratory Investigation* 89 (3): 327–36.
- Nakano, Hirofumi, Yoichi Nakamura, Hiroshi Soda, Megumi Kamikatahira, Kanako Uchida, Mineyo Takasu, Takeshi Kitazaki, et al. 2008. "Methylation Status of Breast Cancer Resistance Protein Detected by Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Analysis Is Correlated Inversely with Its Expression in Drug-Resistant Lung Cancer Cells." *Cancer* 112 (5): 1122–30.
- Nakayama, Akiyoshi, Hirotaka Matsuo, Hirofumi Nakaoka, Takahiro Nakamura, Hiroshi Nakashima, Yuzo Takada, Yuji Oikawa, et al. 2014. "Common Dysfunctional Variants of ABCG2 Have Stronger Impact on Hyperuricemia Progression than Typical Environmental Risk Factors." *Scientific Reports* 4: 5227.
- Nishihashi, Katsuki, Kei Kawashima, Takami Nomura, Yumiko Urakami-Takebayashi, Makoto Miyazaki, Mikiyoshi Takano, and Junya Nagai. 2017. "Cobalt Chloride

- Induces Expression and Function of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Line HK-2." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40 (1): 82–87.
- Oka, Mikako, Chizuko Toyoda, Yuka Kaneko, Yosuke Nakazawa, Eriko Aizu-yokota, and Makoto Takehana. 2010. "Characterization and Localization of Side Population Cells in the Lens." *Molecular Vision* 2010, no. May: 945–53.
- Orowan E. 1955. "The Origin of Man." *Nature* 176: 1955.
- Ozaki, Kouichi, Yozo Ohnishi, Aritoshi Iida, Akihiko Sekine, Ryo Yamada, Tatsuhiko Tsunoda, Hiroshi Sato, et al. 2002. "Functional SNPs in the Lymphotoxin- α Gene That Are Associated with Susceptibility to Myocardial Infarction." *Nature Genetics* 32 (4): 650–54.
- Özvegy, Csilla, András Varadi, Balázs Sarkadi, -, and -. 2002. "Characterization of Drug Transport, ATP Hydrolysis, and Nucleotide Trapping by the Human ABCG2 Multidrug Transporter. Modulation of Substrate Specificity by a Point Mutation." *Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 47980–90.
- Pavek, Petr, Gracia Merino, Els Wagenaar, Ellen Bolscher, Martina Novotna, Johan W Jonker, and Alfred H Schinkel. 2005. "Human Breast Cancer Resistance Protein: Interactions with Steroid Drugs, Hormones, the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-phenylimidazo(4,5-B)pyridine, and Transport of Cimetidine." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (1): 144–52.
- Pavlova, Anna, Hiroyuki Sakurai, Baudouin Leclercq, David R. Beier, Alan S. L. Yu, and Sanjay K. Nigam. 2000. "Developmentally Regulated Expression of Organic Ion Transporters NKT (OAT1), OCT1, NLT (OAT2), and Roct." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278 (4): F635–43.
- Phay, John E., Hamed B. Hussain, and Jeffrey F. Moley. 2000. "Cloning and Expression Analysis of a Novel Member of the Facilitative Glucose Transporter Family, SLC2A9 (GLUT9)." *Genomics* 66 (2): 217–20.
- Phipps-Green, Amanda J, Jade E Hollis-Moffatt, Nicola Dalbeth, Marilyn E Merriman, Ruth Topless, Peter J Gow, Andrew A Harrison, et al. 2010. "A Strong Role for the ABCG2 Gene in Susceptibility to Gout in New Zealand Pacific Island and Caucasian, but Not Māori, Case and Control Sample Sets." *Human Molecular Genetics* 19 (24): 4813–19.
- Pritchard, J B. 1988. "Coupled Transport of P-Aminohippurate by Rat Kidney Basolateral Membrane Vesicles." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 255 (4). American Physiological Society: F597–604.
- Qian, Xiaojing, Dolores D Mruk, Elissa W P Wong, and C Yan Cheng. 2013. "Breast Cancer Resistance Protein Regulates Apical Ectoplasmic Specialization Dynamics Stage Specifically in the Rat Testis." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, no. 32: 757–69.
- Rabindran, Sridhar K, Haiyin He, Maya Singh, Eileen Brown, Karen I Collins, I Annable, and Lee M Greenberger. 1998. "Reversal of a Novel Multidrug Resistance Mechanism in Human Colon Carcinoma Cells by Fumitremorgin C." *Cancer Research* 58: 5850–59.
- Rabindran, Sridhar K, Douglas D Ross, L Austin Doyle, Weidong Yang, and Lee M Greenberger. 2000. "Fumitremorgin C Reverses Multidrug Resistance in Cells Transfected with the Breast Cancer Resistance Protein 1." *Cancer Research*, 47–50.
- Rajagopalan, P T Ravi, Zhiquan Zhang, Lynn Mccourt, Mary Dwyer, Stephen J Benkovic, Gordon G Hammes, J Gttctgc-, and J Acctgcc-. 2002. "Interaction of Dihydrofolate Reductase with Methotrexate : Ensemble and Single-Molecule

- Kinetics." *PNAS* 99 (21): 1–6.
- Ramazzina, Ileana, Claudia Folli, Andrea Secchi, Rodolfo Berni, and Riccardo Percudani. 2006. "Completing the Uric Acid Degradation Pathway through Phylogenetic Comparison of Whole Genomes." *Nature Chemical Biology* 2 (3): 144–48.
- Reznicek, Josef, Martina Ceckova, Lenka Tupova, and Frantisek Staud. 2016. "Etravirine Inhibits ABCG2 Drug Transporter and Affects Transplacental Passage of Tenofovir Disoproxil Fumarate." *Placenta*.
- Richardson, S., G. Neama, T. Philips, S. Bell, S. D. Carter, K. H. Moley, J. F. Moley, S. J. Vannucci, and A. Mobasher. 2003. "Molecular Characterization and Partial cDNA Cloning of Facilitative Glucose Transporters Expressed in Human Articular Chondrocytes; Stimulation of 2-Deoxyglucose Uptake by IGF-I and Elevated MMP-2 Secretion by Glucose Deprivation." *Osteoarthritis and Cartilage* 11 (2): 92–101.
- Robey, R W, Y Honjo, K Morisaki, T A Nadjem, S Runge, M Risbood, M S Poruchynsky, and S E Bates. 2003. "Mutations at Amino-Acid 482 in the ABCG 2 Gene Affect Substrate and Antagonist Specificity." *British Journal of Cancer* 89: 1971–78.
- Saison, Carole, Virginie Helias, A.Bryan Ballif, Thierry Peyrard, Hervé Puy, and Toru Miyazaki. 2013. "Null Alleles of ABCG2 Encoding the Breast Cancer Resistance Protein Define the New Blood Group System Junior." *Nat Genet.* 44 (2): 174–77.
- Scott, G. S., and D. C. Hooper. 2001. "The Role of Uric Acid in Protection against Peroxynitrite-Mediated Pathology." *Medical Hypotheses* 56 (1): 95–100.
- Sesink, Aloys L A, Ilja C W Arts, Vincent C J De Boer, Pauline Breedveld, Jan H M Schellens, Peter C H Hollman, and Frans G M Russel. 2006. "Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1 / Abcg2) Limits Net Intestinal Uptake of Quercetin in Rats by Facilitating Apical Efflux of Glucuronides." *Molecular Pharmacology* 67 (6): 1999–2006.
- Shigeta, Junichi, Kazuhiro Katayama, Junko Mitsuhashi, Kohji Noguchi, and Yoshikazu Sugimoto. 2010. "BCRP/ABCG2 Confers Anticancer Drug Resistance without Covalent Dimerization." *Cancer Sci* 101 (8): 1813–21.
- Shubbar, Maryam H, Jeffrey I Penny, -, and -. 2018. "Effect of Amyloid Beta on ATP-Binding Cassette Transporter Expression and Activity in Porcine Brain Microvascular Endothelial Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1862 (10): 2314–22.
- Shukla, Suneet, Chung-pu Wu, Krishnamachary Nandigama, and Suresh V Ambudkar. 2007. "The Naphthoquinones , Vitamin K3 and Its Structural Analogue Plumbagin , Are Substrates of the Multidrug Resistance – Linked ATP Binding Cassette Drug Transporter ABCG2." *Molecular Cancer Ther* 6 (December): 3279–87.
- Scharenberg, Christian W, Michael A Harkey, Beverly Torok-storb, and -. 2017. "The ABCG2 Transporter Is an Efficient Hoechst 33342 Efflux Pump and Is Preferentially Expressed by Immature Human Hematopoietic Progenitors." *Blood* 99 (2): 507–13.
- Schrackx, Jan, Yuri Lektarau, J. Fink-Gremmels, and -. 2006. "Ochratoxin A Secretion by ATP-Dependent Membrane Transporters in Caco-2 Cells." *Archives of Toxicology* 80 (5): 243–49.
- Sjöstedt, Noora, Jeroen J.M.W. van den Heuvel, Jan B. Koenderink, and Heidi Kidron. 2017. "Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2."

- Pharmaceutical Research* 34 (8). Pharmaceutical Research: 1626–36.
- Skoglund, Karin, Samuel Boiso Moreno, Jan Ingvar Jönsson, Svante Vikingsson, Björn Carlsson, and Henrik Gréen. 2014. "Single-Nucleotide Polymorphisms of ABCG2 Increase the Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitors in the K562 Chronic Myeloid Leukemia Cell Line." *Pharmacogenetics and Genomics* 24 (1): 52–61.
- Stein, Ulrike, Hermann Lage, Andreas Jordan, Wolfgang Walther, Susan E. Bates, Thomas Litman, Peter Hohenberger, and Manfred Dietel. 2002. "Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-Glycoprotein on Thermoresistant Variants of Atypical and Classical Multidrug Resistant Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 97 (6): 751–60.
- Stiburkova, Blanka, Katerina Pavelcova, Jakub Zavada, Lenka Petru, Pavel Simek, Pavel Cepek, Marketa Pavlikova, Hirotaka Matsuo, Tony R. Merriman, and Karel Pavelka. 2017. "Functional Non-Synonymous Variants of ABCG2 and Gout Risk." *Rheumatology (United Kingdom)* 56 (11): 1982–92.
- Sugimoto, Ryusei, Hiroshi Watanabe, Komei Ikegami, Yuki Enoki, Tadashi Imafuku, Yoshiaki Sakaguchi, Michiya Murata, et al. 2017. "Down-Regulation of ABCG2, a Urate Exporter, by Parathyroid Hormone Enhances Urate Accumulation in Secondary Hyperparathyroidism." *Kidney International* 91 (3). Elsevier Inc: 658–70.
- Summer, Ross, Darrell N Kotton, Xi Sun, Bei Ma, Kathleen Fitzsimmons, Alan Fine, Darrell N Kotton, et al. 2003. "Side Population Cells and Bcrp1 Expression in Lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2118: 97–104.
- Sundy, John S., and Michael S. Hershfield. 2007. "Uricase and Other Novel Agents for the Management of Patients with Treatment-Failure Gout." *Current Rheumatology Reports* 9 (3): 258–64.
- Suzuki, Michiko, Hiroshi Suzuki, Yoshikazu Sugimoto, and Yuichi Sugiyama. 2003. "ABCG2 Transports Sulfated Conjugates of Steroids and Xenobiotics." *Journal of Biological Chemistry*.
- Sweet, Douglas H., Natascha A. Wolff, and John B. Pritchard. 1997. "Expression Cloning and Characterization of ROAT1." *Journal of Biological Chemistry* 272 (48): 30088–95.
- Szatmari, Istvan, György Vámosi, Peter Brazda, Balint L. Balint, Szilvia Benko, Lajos Széles, Viktoria Jeney, et al. 2006. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Regulated ABCG2 Expression Confers Cytoprotection to Human Dendritic Cells." *Journal of Biological Chemistry* 281 (33): 23812–23.
- Szilagyi, John T., Gabriella M. Composto-Wahler, Laurie B. Joseph, Bingbing Wang, Todd Rosen, Jeffrey D. Laskin, and Lauren M. Aleksunes. 2019. "Anandamide down-Regulates Placental Transporter Expression through CB2 Receptor-Mediated Inhibition of cAMP Synthesis." *Pharmacological Research* 141. Elsevier Ltd: 331–42.
- Takada, T., T. Yamamoto, H. Matsuo, J. K. Tan, K. Ooyama, M. Sakiyama, H. Miyata, et al. 2018. "Identification of ABCG2 as an Exporter of Uremic Toxin Indoxyl Sulfate in Mice and as a Crucial Factor Influencing CKD Progression." *Scientific Reports* 8 (1): 1–9.
- Tamura, A., Masato Watanabe, Hikaru Saito, Hiroshi Nakagawa, Toshiaki Kamachi, Ichiro Okura, and Toshihisa Ishikawa. 2006. "Functional Validation of the Genetic Polymorphisms of Human ABC Transporter ABCG2: Identification of Alleles That Are Defective in Porphyrin Transport." *Molecular Pharmacology* 70 (1): 287–96.
- Tamura, Ai, Kanako Wakabayashi, Yuko Onishi, Misako Takeda, Yoji Ikegami, Seigo

- Sawada, Masahisa Tsuji, Yoichi Matsuda, and Toshihisa Ishikawa. 2007. "Re-Evaluation and Functional Classification of Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms of the Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2." *Cancer Science* 98 (2): 231–39.
- Tan, Kee W., Angelina Sampson, Bremansu Osa-Andrews, and Surtaj H. Iram. 2018. "Calcitriol and Calcipotriol Modulate Transport Activity of ABC Transporters and Exhibit Selective Cytotoxicity in MRP1-Overexpressing Cells." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 46 (12): 1856–66.
- Tanaka, M, I Kamada, J Takahashi, T Kimura, and Y Tani. 2018. "Genotyping of the ABCG2 Gene Using Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Transfusion Medicine* 28 (3). John Wiley & Sons, Ltd (10.1111): 255–60.
- Taniguchi, K., Y. Tamura, T. Kumagai, S. Shibata, and S. Uchida. 2016. "Stimulation of V1a Receptor Increases Renal Uric Acid Clearance via Urate Transporters: Insight into Pathogenesis of Hypouricemia in SIADH." *Clinical and Experimental Nephrology* 20 (6). Springer Japan: 845–52.
- Telbisz, Ágnes, Csilla Hegedűs, András Váradi, Balázs Sarkadi, and Csilla Özvegy-Laczka. 2014. "Special Section on Transporters in Toxicity and Disease Regulation of the Function of the Human ABCG2 Multidrug Transporter by Cholesterol and Bile Acids : Effects of Mutations in Potential Substrate and Steroid Binding Sites S." *Drug Metabolism and Disposition*, no. April: 575–85.
- Telbisz, Ágnes, Marianna Müller, Csilla Özvegy-Laczka, László Homolya, Lajos Szente, András Váradi, and Balázs Sarkadi. 2007. "Membrane Cholesterol Selectively Modulates the Activity of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768 (11): 2698–2713.
- Telbisz, Ágnes, Csilla Özvegy-Laczka, Tamás Hegedűs, András Váradi, and Balázs Sarkadi. 2012. "Effects of the Lipid Environment, Cholesterol and Bile Acids on the Function of the Purified and Reconstituted Human ABCG2 Protein." *Biochemical Journal* 450 (2): 387–95.
- Telbisz A., Özvegy-Lacska C., Hegedus T. Váradi A., Sarkádi B. 2013. "Effects of the Lipid Environment, Cholesterol and Bile Acids on the Function of the Purified and Reconstituted Human ABCG2 Protein." *The Biochemical Journal* 450: 387–95.
- To, K. K. W., Z. Zhan, S. E. Bates, and -. 2006. "Aberrant Promoter Methylation of the ABCG2 Gene in Renal Carcinoma." *Molecular and Cellular Biology* 26 (22): 8572–85.
- Toyoda, Mančíková, Krylov, Morimoto, Pavelcová, Bohatá, Pavelka, et al. 2019. "Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort." *Cells* 8 (4): 363.
- Toyoki, Daigo, Shigeru Shibata, Emiko Kuribayashi-Okuma, Ning Xu, Kenichi Ishizawa, Makoto Hosoyamada, and Shunya Uchida. 2017. "Insulin Stimulates Uric Acid Reabsorption via Regulating Urate Transporter 1 and ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 313 (3): F826–34.
- Tzovaras, V., A. Chatzikyriakidou, E. Bairaktari, E. N. Liberopoulos, I. Georgiou, and M. Elisaf. 2007. "Absence of SLC22A12 Gene Mutations in Greek Caucasian Patients with Primary Renal Hypouricaemia." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 67 (6): 589–95.
- Uchino, Hiroshi, Ikumi Tamai, Hikaru Yabuuchi, Kayoko China, Ken Ichi Miyamoto, Eiji Takeda, and Akira Tsuji. 2000. "Faropenem Transport across the Renal

- Epithelial Luminal Membrane via Inorganic Phosphate Transporter Npt1." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 574–
- Vethanayagam, R. R., Honggang Wang, Anshul Gupta, Yi Zhang, Fred Lewis, Jashvant D. Unadkat, and Qingcheng Mao. 2005. "Functional Analysis of the Human Variants of Breast Cancer Resistance Protein: I206L, N590Y, and D620N." *Drug Metabolism and Disposition* 33 (6): 697–705.
- Vitart, Veronique, Igor Rudan, Caroline Hayward, Nicola K Gray, James Floyd, Colin N A Palmer, Sara A Knott, et al. 2008. "SLC2A9 Is a Newly Identified Urate Transporter Influencing Serum Urate Concentration, Urate Excretion and Gout." *Nature Genetics* 40 (March). Nature Publishing Group: 437.
- Volk, Erin L, and Erasmus Schneider. 2003. "Wild-Type Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2) Is a Methotrexate Polyglutamate Transporter 1." *Cancer Research* 63: 5538–43.
- Voruganti, V. Saroja, Sandra Laston, Karin Haack, Nitesh R. Mehta, Shelley A. Cole, Nancy F. Butte, and Anthony G. Comuzzie. 2015. "Serum Uric Acid Concentrations and SLC2A9 Genetic Variation in Hispanic Children: The Viva La Familia Study." *American Journal of Clinical Nutrition*
- Wakabayashi, Kanako, Hiroshi Nakagawa, Ai Tamura, Shoko Koshiba, Kazuyuki Hoshijima, Masayuki Komada, and Toshihisa Ishikawa. 2007. "Intramolecular Disulfide Bond Is a Critical Check Point Determining Degradative Fates of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 Protein." *Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 27841–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700133200>.
- Walker, JE, M Saraste, J.M Runswick, and N.J Gay. 1982. "Distantly Related Sequences in the Alpha- and Beta-Subunits of ATP Synthase, Myosin, Kinases and Other ATP-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold." *EMBO J.* 1 (8): 945–51.
- Wang, Honggang, Eun-woo Lee, Xiaokun Cai, Zhanglin Ni, Lin Zhou, and Qingcheng Mao. 2008. "Membrane Topology of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP /ABCG2) Determined by Epitope Insertion and Immunofluorescenc." *Biochemistry* 47: 13778–87.
- Wang, Honggang, Eun-woo Lee, Lin Zhou, Peter C K Leung, Douglas D Ross, Jashvant D Unadkat, and Qingcheng Mao. 2008. "Progesterone Receptor (PR) Isoforms PRA and PRB Differentially Regulate Expression of the Breast Cancer Resistance Protein in Human Placental Choriocarcinoma BeWo Cells." *Molecular Pharmacology* 73 (3): 845–54.
- Wang, Ze, Tao Cui, Xiaoyan Ci, Fang Zhao, Yinghui Sun, Yazhuo Li, Rui Liu, Weidang Wu, Xiulin Yi, and Changxiao Liu. 2019. "The Effect of Polymorphism of Uric Acid Transporters on Uric Acid Transport." *Journal of Nephrology* 32 (2). Springer International Publishing: 177–87. ***
- Watanabe, Susumu, Duk Hee Kang, Lili Feng, Takahiko Nakagawa, John Kanellis, Hui Lan, Marilda Mazzali, and Richard J. Johnson. 2002. "Uric Acid, Hominoid Evolution, and the Pathogenesis of Salt-Sensitivity." *Hypertension* 40 (3): 355–60.
- Weidner, L. D., S. S. Zoghbi, S. Lu, S. Shukla, S. V. Ambudkar, V. W. Pike, J. Mulder, M. M. Gottesman, R. B. Innis, and M. D. Hall. 2015. "The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 354 (3): 384–93.
- Whyte-Allman, Sana-Kay, Md Tozammel Hoque, Mohammad-Ali Jenabian, Jean-Pierre Routy, and Reina Bendayan. 2017. "Xenobiotic Nuclear Receptors Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate

- Antiretroviral Drug Efflux Transporters at the Blood-Testis Barrier." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 363 (3): 324–35.
- Wilhelm, Scott M, Lila Adnane, Philippa Newell, Augusto Villanueva, Josep M Llovet, and Mark Lynch. 2008. "Preclinical Overview of Sorafenib , a Multikinase Inhibitor That Targets Both Raf and VEGF and PDGF Receptor Tyrosine Kinase Signaling." *Mol Cancer Ther* 7: 3129–41.
- Windass, A. S., S. Lowes, Y. Wang, and C. D. A. Brown. 2007. "The Contribution of Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3 to the Renal Uptake of Rosuvastatin." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322 (3): 1221–27.
- Woodward, O. M., Anna Köttgen, Josef Coresh, Eric Boerwinkle, William B Guggino, and Michael Köttgen. 2009. "Identification of a Urate Transporter, ABCG2, with a Common Functional Polymorphism Causing Gout." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10338–42.
- Woodward, O. M., D. N. Tukaye, J. Cui, P. Greenwell, L. M. Constantoulakis, B. S. Parker, A. Rao, M. Kottgen, P. C. Maloney, and W. B. Guggino. 2013. "Gout-Causing Q141K Mutation in ABCG2 Leads to Instability of the Nucleotide-Binding Domain and Can Be Corrected with Small Molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13): 5223–28.
- Wu, Wei, Neema Jamshidi, Satish A Eraly, Henry C Liu, Kevin T Bush, Bernhard O Palsson, and Sanjay K Nigam. 2013. "Multispecific Drug Transporter Slc22a8 (Oat3) Regulates Multiple Metabolic and Signaling Pathways S," no. October: 1825–34.
- Xie, Yi, Takeo Nakanishi, Karthika Natarajan, Lowell Safren, Anne W Hamburger, Arif Hussain, and Douglas D Ross. 2015. "Functional Cyclic AMP Response Element in the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Promoter Modulates Epidermal Growth Factor Receptor Pathway- or Androgen Withdrawal-Mediated BCRP/ABCG2 Transcription in Human Cancer Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1849 (3): 317–27.
- Xu, P, Z L Ling, J Zhang, Y Li, N Shu, Z Y Zhong, Y Chen, et al. 2016. "Unconjugated Bilirubin Elevation Impairs the Function and Expression of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) at the Blood-Brain Barrier in Bile Duct-Ligated Rats." *Acta Pharmacol Sin* 37 (8). Nature Publishing Group: 1–12.
- Yamagishi, Kazumasa, Takeshi Tanigawa, Akihiko Kitamura, Anna Köttgen, Aaron R. Folsom, and Hiroyasu Iso. 2010. "The rs2231142 Variant of the ABCG2 Gene Is Associated with Uric Acid Levels and Gout among Japanese People." *Rheumatology* 49 (8): 1461–65.
- Yoshioka, Sho, Kazuhiro Katayama, Chikako Okawa, Sachiko Takahashi, Satomi Tsukahara, Junko Mitsuhashi, and Yoshikazu Sugimoto. 2007. "The Identification of Two Germ-Line Mutations in the Human Breast Cancer Resistance Protein Gene That Result in the Expression of a Low/non-Functional Protein." *Pharmaceutical Research* 24 (6): 1108–17.
- Yousif, Salah, Cynthia Marie-Claire, Françoise Roux, Jean Michel Scherrmann, and Xavier Declèves. 2007. "Expression of Drug Transporters at the Blood-Brain Barrier Using an Optimized Isolated Rat Brain Microvessel Strategy." *Brain Research* 1134 (1). Elsevier B.V.: 1–11.
- Zamber, Charis P, Jatinder K Lamba, Kazuto Yasuda, Jennifer Farnum, Kenneth Thummel, John D Schuetz, and Erin G Schuetz. 2003. "Natural Allelic Variants of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and Their Relationship to BCRP Expression in Human Intestine." *Pharmacogenetics and Genomics* 13 (1).

- Zámbó, Boglárka, Zsuzsa Bartos, Orsolya Móznér, Edit Szabó, György Várady, Gyula Poór, Márton Pálkás, et al. 2018. "Clinically Relevant Mutations in the ABCG2 Transporter Uncovered by Genetic Analysis Linked to Erythrocyte Membrane Protein Expression." *Scientific Reports* 8 (1): 1–13.
- Zámbó, Boglárka, Orsolya Móznér, Zsuzsa Bartos, György Török, György Várady, Ágnes Telbisz, László Homolya, Tamás I. Orbán, and Balázs Sarkadi. 2019. "Cellular Expression and Function of Naturally Occurring Variants of the Human ABCG2 Multidrug Transporter." *Cellular and Molecular Life Sciences*, no. 123456789. Springer International Publishing.
- Zhang, Yi, Honggang Wang, Jashvant D Unadkat, and Qingcheng Mao. 2007. "Breast Cancer Resistance Protein 1 Limits Fetal Distribution of Nitrofurantoin in the Pregnant Mouse." *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* 35 (12): 2154–58.
- Zhou, Danqiu, Yunqing Liu, Xinju Zhang, Xiaoye Gu, Hua Wang, Xinhua Luo, Jin Zhang, Hejian Zou, and Ming Guan. 2014. "Functional Polymorphisms of the ABCG2 Gene Are Associated with Gout Disease in the Chinese Han Male Population." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (5): 9149–59.
- Zhou, Sheng, John J Morris, Yuxiao Barnes, Lubin Lan, John D Schuetz, and Brian P Sorrentino. 2002. "Bcrp1 Gene Expression Is Required for Normal Numbers of Side Population Stem Cells in Mice , and Confers Relative Protection to Mitoxantrone in Hematopoietic Cells in Vivo." *PNAS* 99 (19): 12339–44.

Internetové zdroje:

Databáze www.ensembl.org